



TITLE:

糖修飾を利用した細胞選択的薬物 ターゲティングシステムの開発に 関する研究(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

西川, 元也

CITATION:

西川, 元也. 糖修飾を利用した細胞選択的薬物ターゲティングシステムの開発に関する研究. 京都大学, 1996, 博士(薬学)

ISSUE DATE:

1996-11-25

URL:

<https://doi.org/10.11501/3120329>

RIGHT:

糖修飾を利用した細胞選択的薬物ターゲティング
システムの開発に関する研究

西 川 元 也

糖修飾を利用した細胞選択的薬物ターゲティング システムの開発に関する研究

西 川 元 也

目 次

総論の部	1
緒言	1
第 I 章 糖修飾 BSA 誘導体を用いた糖修飾高分子の体内動態特性の解明	2
I-1 糖修飾高分子の肝移行動態評価に適した放射標識法の選択	2
1-a Gal-BSA の合成およびその物理化学的性質	3
1-b 放射標識	4
1-c 静脈内投与後の体内挙動	4
1-d 体内動態の薬動学的解析	6
I-2 糖修飾高分子の肝移行動態の解析	8
2-a 糖修飾 BSA の合成およびその物理化学的性質	8
2-b 静脈内投与後の体内挙動	9
2-c 肝臓構成細胞間での分布	10
2-d in vivo 体内挙動特性の評価法	11
2-e 糖修飾 BSA の体内動態の薬動学的解析	14
I-3 生理学的薬動学モデルに基づく糖修飾 BSA の非線形肝移行動態の解析	16
3-a 生理学的薬動学モデルの構築	16
3-b モデルに基づくパラメータの算出	18
I-4 dextran 体内動態への生理学的薬動学モデル解析の適用	19
4-a dextran の放射標識体の合成および体内挙動	19
4-b Gal-BSA との同時投与時の体内挙動	21
4-c 体内動態の薬動学的解析	21
4-d 生理学的薬動学モデルによる解析	22
I-5 考察	23
第 II 章 肝臓指向性キャリアーの開発とそれを利用した薬物ターゲティング	26
II-1 dextran を利用した肝臓指向性キャリアーの開発	27
1-a 糖修飾 dextran 誘導体の合成およびその物理化学的性質	27
1-b 静脈内投与後の体内挙動	27
1-c 糖修飾 dextran 誘導体の肝臓取り込みにおける糖特異性の確認	28
1-d 体内動態の薬動学的解析	30
II-2 ara-C の肝細胞へのターゲティング	30
2-a ara-C-Gal-CMD 結合体の合成およびその物理化学的性質	31
2-b 静脈内投与時の体内挙動	32
2-c 体内動態の薬動学的解析	33
II-3 PLGA を骨格とする生分解性肝細胞選択的キャリアーの開発	34
3-a Gal-PLGA の合成およびその物理化学的性質	36
3-b PLGA 誘導体の静脈内投与後の体内挙動	36
3-c 体内動態の薬動学的解析	37
3-d Gal-PLGA の分解性評価	38

II-4	vitamin K ₅ の肝細胞ターゲティングによる血液凝固能改善効果	39
4-a	vitamin K ₅ -Gal-PLGA 結合体の合成およびその物理化学的性質	40
4-b	静脈内投与時の体内挙動および薬動学的解析	40
4-c	vitamin K ₅ -Gal-PLGA 投与による warfarin 処理マウスの血液凝固能改善効果	41
II-5	考察	42
第III章	糖修飾による SOD の肝臓ターゲティングと虚血・再灌流障害に対する治療効果改善	45
III-1	各種化学修飾による SOD の体内動態制御	46
1-a	SOD 誘導体の合成およびその物理化学的性質	46
1-b	SOD 誘導体の静脈内投与時の体内挙動	47
1-c	体内動態の薬動学的解析	49
III-2	肝臓の虚血・再灌流障害に対する SOD 誘導体の抑制効果	50
2-a	肝虚血・再灌流障害モデルの作成	51
2-b	肝虚血・再灌流障害の評価法の確立	51
2-c	SOD 誘導体投与による障害抑制効果	52
III-3	考察	53
第IV章	体内動態の速度論的解析に基づく糖修飾タンパク質の分子設計	56
IV-1	galactose 修飾タンパク質の合成およびその物理化学的性質	57
IV-2	肝移行動態に及ぼす galactose 修飾タンパク質の分子量の影響	57
2-a	未修飾タンパク質の静脈内投与後の体内挙動	57
2-b	galactose 修飾タンパク質の静脈内投与後の体内挙動	58
2-c	体内動態の薬動学的解析	61
IV-3	肝移行動態に及ぼす galactose 修飾タンパク質の galactose 修飾率の影響	62
3-a	修飾率の異なる galactose 修飾タンパク質の静脈内投与後の体内挙動	62
3-b	体内動態の薬動学的解析	64
IV-4	galactose 修飾タンパク質の肝移行動態を決定する要因の解明	65
4-a	生理学的薬動学モデルに基づく galactose 修飾タンパク質の体内動態解析	66
4-b	galactose 修飾タンパク質の薬動学パラメータと galactose 修飾率との相関	68
IV-5	考察	70
結論	73
謝辞	75
実験の部	76
第I章	実験の部	76
第II章	実験の部	79
第III章	実験の部	83
第IV章	実験の部	86
引用文献	87

総 論 の 部

緒 言

高い生理活性を有する薬物には微量で強い治療効果を発現する反面副作用が強いものが多く、それらを有効に臨床適用するためには、薬物の体内動態を厳密に制御し作用部位へ望ましい濃度-時間パターンのもとに送達することにより薬物投与の最適化を実現するドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発が求められる。中でも、生体内の特異的認識現象を利用する薬物ターゲティングは、薬物の有効性の向上ならびに毒性の軽減を達成可能な方法として有望視されている。肝細胞が有するアシアロ糖タンパク質レセプターをはじめとする糖鎖認識機構^{1,2)}は、特定の細胞に発現した厳密な基質認識性を有することから、細胞選択的ターゲティングへの利用が期待されており、これまでも糖タンパク質あるいは糖修飾高分子をキャリアーとした薬物ターゲティングが試みられてきた³⁻⁷⁾。しかしながら、合理的な薬物キャリアーの分子設計あるいは理論に基づく投与計画、動態予測を行うには、糖修飾高分子の物理化学的・生物学的特性と全身投与後の体内動態特性との間の関連を速度論的な視点から解明することが必須であるものの、糖修飾高分子の体内動態に関する薬動学的情報は乏しいのが現状である。

著者は、糖認識を利用したターゲティングシステムを体内動態解析に基づいて合理的に開発することを目的として、まず bovine serum albumin の糖修飾体を用い、糖修飾高分子の基本的な体内動態特性を薬動学的解析を通じて明らかにした。次に、得られた情報に基づき細胞選択的高分子キャリアーシステムを開発して肝細胞選択的薬物ターゲティングへの適用を検討し、また活性酸素の関与する種々の疾患の治療薬として期待されているヒト型遺伝子組換え superoxide dismutase を用いた検討から、タンパク質医薬品に対しても糖認識によるターゲティングが治療効果改善に有効であることを示した。さらに、種々の galactose 修飾タンパク質の体内挙動特性の薬動学的解析により、ターゲティングに適したタンパク質医薬品誘導体化の分子設計に関する指針を得た。

以下、これらの結果について四章にわたり論述する。

第 I 章 糖修飾 BSA 誘導体を用いた糖修飾高分子の体内動態特性の解明

薬物の治療効果ならびに副作用は、薬物固有の生理活性と生体内運命の組み合わせにより決定される。従って、DDS の技術を用いて薬物の体内動態を制御することは多くの薬物の有効性を飛躍的に向上させると考えられる^{8,9)}。中でも薬物ターゲティングは、体循環に到達した薬物の分布過程を制御する技術であり、様々な疾病治療においてターゲティング技術を用いることによる標的への選択的な薬物送達が期待されている。

高分子物質は数多くの薬物を結合可能であり、またそれぞれの物理化学的性質に対応した特徴的な体内挙動を示すことから、薬物を標的部位へ送達するキャリアーとして有望視されている。特に、標的部位と強い親和性を有する構造を導入することにより能動的かつ選択的なターゲティングが達成されることが考えられ、生体内の特異性の高い認識現象として糖鎖認識機構^{1,2)}の利用が期待されている。中でも Ashwell ら¹⁰⁾により見いだされた肝実質細胞上のアシアロ糖タンパク質レセプターに関しては、ウサギ肝臓から単離された^{11,12)}のを端緒としてヒトを含め複数の動物種においてレセプタータンパク質のアミノ酸配列が決定されており^{13,14)}、また細胞膜でのレセプターサブユニットの空間配置と対応した糖鎖を効率よく結合することが報告されている¹⁵⁻¹⁸⁾。また、Kupffer 細胞をはじめとするマクロファージおよび肝臓血管内皮細胞に存在するマンノースレセプターについても構造ならびにリガンドとの結合特性が報告されている^{19,20)}。これら両レセプターは特定の細胞に発現し基質認識性も明らかであることから、これらの機構を介して、抗ウイルス剤²¹⁻²⁷⁾、抗癌剤²⁸⁻³⁰⁾、抗炎症薬³¹⁾、肝機能診断薬³²⁻³⁴⁾、抗肝毒素³⁵⁾、欠損酵素³⁶⁾、アンチセンスオリゴヌクレオチド³⁷⁾あるいは遺伝子³⁸⁻⁴³⁾などを糖タンパク質^{21,35-41)}をはじめとする種々の糖修飾高分子^{22-26,28-34,42)}あるいは微粒子^{27,43,44)}を用いたターゲティングが試みられている。しかしながら、これらの研究では送達された薬物の効果発現に主眼がおかれているため、糖タンパク質や糖修飾高分子の体内動態特性を薬物速度論の立場から検討した例は殆ど存在しない。合理的な薬物キャリアーの合成ならびに理論に基づいた投与設計、動態予測には薬動学的なアプローチが不可欠であると考えられる。

そこで本章においては、糖修飾高分子を用いたターゲティングシステムの開発において、その定量的評価法に関する基礎的な情報を得るため、薬理活性が殆どなく、生体内で安定かつ生体適合性が高く、化学構造および物理化学的性質がよく知られており、さらには化学修飾も容易であることから低分子薬物に対する高分子修飾素材としても幅広く用いられている bovine serum albumin (BSA) をモデル高分子として選択し、種々の糖分子を導入した誘導体を合成し、静脈内投与後の体内動態を肝臓移行動態を中心に検討した⁴⁵⁾。

I-1 糖修飾高分子の肝移行動態評価に適した放射標識法の選択

高分子の体内動態評価に際しては、放射性同位元素を用いた放射標識が簡便かつ高感度である

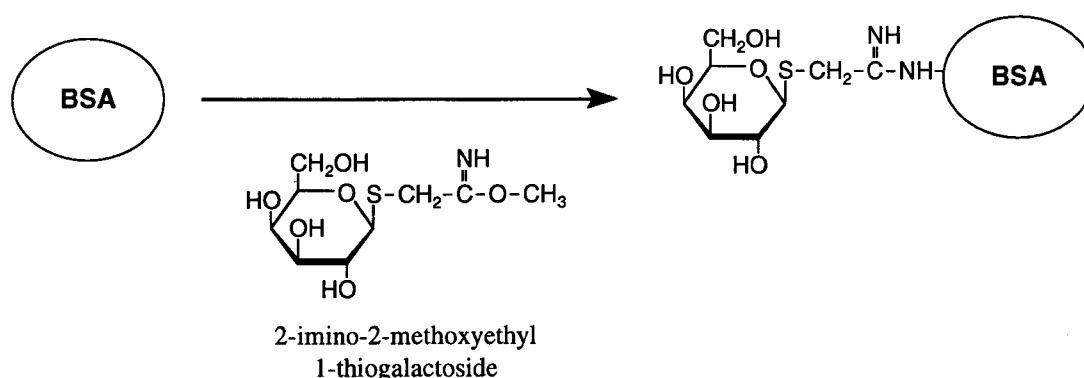


Fig. 1 Synthetic procedure of galactosylated bovine serum albumin (Gal-BSA).

ことから幅広く利用されている。高分子の循環血液中から各組織への移行性は、血中で安定であり、また組織移行後には長時間その組織中に残存する放射標識法を用いることにより評価可能であると思われる。本節では、galactose 修飾 BSA (Gal-BSA) をモデル糖修飾高分子とし、放射標識法の中で一般に広く用いられる 3 種類の標識法を取り上げ、糖修飾高分子の体内動態特性評価に適した放射標識法について検討した。

1-a Gal-BSA の合成およびその物理化学的性質

Gal-BSA は、Lee らの方法⁴⁶⁾に従い予め合成した 2-imino-2-methoxyethyl 1-thiogalactoside (IME-thiogalactoside) を BSA の amino 基と反応させることにより合成した (Fig. 1)。得られた Gal-BSA は、1 分子あたり約 33 個の galactose を含んでおり、クロマトフォーカシングにより測定した結果、未修飾 BSA と同じ等電点 (4.8 ~ 4.9) を示した。

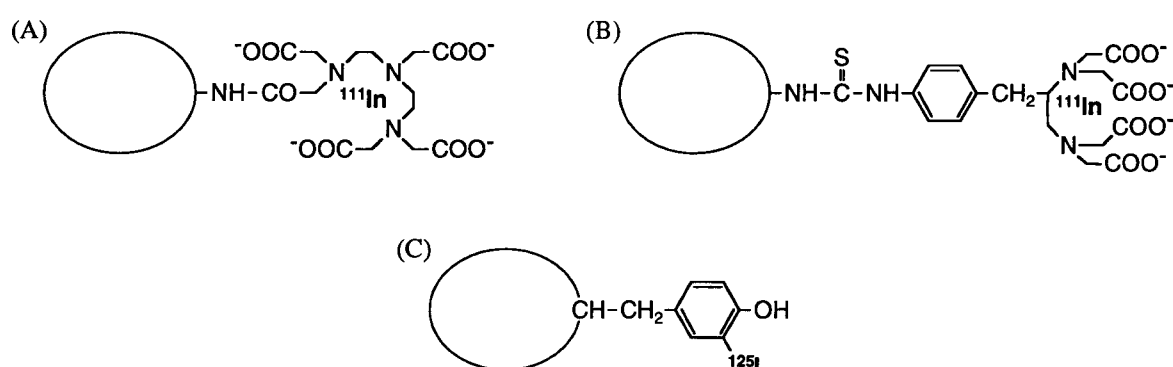


Fig. 2 Chemical structures of Gal-BSA radiolabeled by different methods. (A), ^{111}In -labeled Gal-BSA using DTPA dianhydride (^{111}In -DTPA-Gal-BSA); (B), ^{111}In -labeled Gal-BSA using benzyl EDTA (^{111}In -Bz-EDTA-Gal-BSA); (C), ^{125}I -labeled Gal-BSA (^{125}I -Gal-BSA).

1-b 放射標識

Gal-BSA に対し以下の 3 種類の方法で放射標識を施した。Hnatowich らの方法⁴⁷⁾に従い、2 官能性キレート試薬 diethylenetriaminepentaacetic dianhydride (cDTPA) を Gal-BSA の amino 基に導入後、 $^{111}\text{InCl}_3$ を結合させることにより ^{111}In 標識を施した (^{111}In -DTPA-Gal-BSA)。また、cDTPA よりも indium との生体内安定性が高いことが報告⁴⁸⁾されている 1-(4-isothiocyanobenzyl)ethylenediaminetetraacetic acid (SCN-Bz-EDTA) を用いた ^{111}In 標識も cDTPA と同様 amino 基に導入後 ^{111}In 標識を施した (^{111}In -Bz-EDTA-Gal-BSA)⁴⁹⁾。さらに、chloramine-T 法⁵⁰⁾により ^{125}I を用いて放射標識を施した (^{125}I -Gal-BSA)。Fig. 2 に、各放射標識 Gal-BSA の化学構造を示した。

1-c 静脈内投与後の体内挙動

Fig. 3 に、各放射標識 Gal-BSA を非標識体で濃度を調製後 1 mg/kg の投与量でマウスに尾静脈内投与した時の放射活性の血漿中濃度ならびに肝臓中量の経時変化を示した。 ^{125}I -Gal-BSA 投与時の血漿サンプルに関しては、トリクロロ酢酸 (TCA) 沈殿性放射活性も併せて示した。肝臓への移行は、投与後 5 分までの初期段階ではいずれの標識体の場合にも投与量の約 80 % が経時的に移行するほぼ等しい移行パターンを示した。しかし、 ^{125}I -Gal-BSA 投与時の肝臓中放射活性は両 ^{111}In 標識体と比較して 5 分以降非常に速やかな減少を示し、投与後 30 分の時点で既に投与量の 10 % 以下となり、それ以降も減少し続けた。また、両 ^{111}In 標識体間でも 10 分以降の肝臓中放射活性量の経時変化には違いが認められ、 ^{111}In -DTPA-Gal-BSA の場合には投与後 24 時間の時点においても

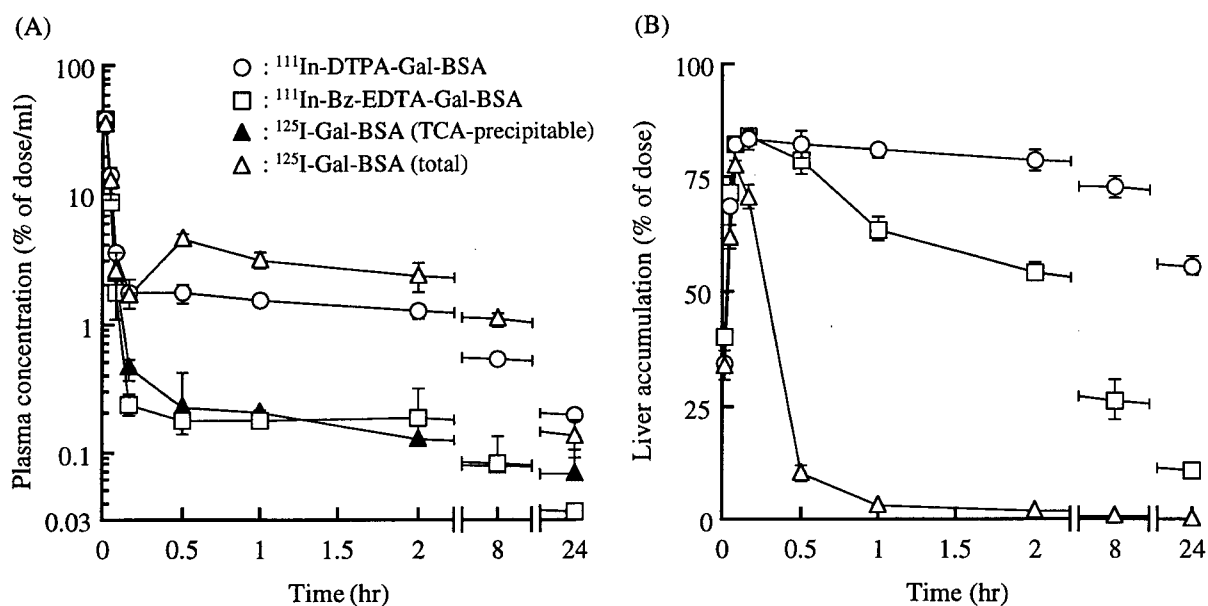


Fig. 3 Plasma concentration (A) and liver accumulation (B) of radioactivity after intravenous injection of Gal-BSA radiolabeled by different methods. Results are expressed as the mean \pm SD of three mice.

10 分後に肝臓中に回収された最大放射活性の約 70 % が依然存在したのに対し、 $^{111}\text{In-Bz-EDTA-Gal-BSA}$ の場合には投与量の約 10 % しか残存しなかった。

血漿中放射活性の濃度推移についても各標識体間で違いが認められた。 $^{111}\text{In-Bz-EDTA-Gal-BSA}$ の血漿中放射活性濃度は $^{125}\text{I-Gal-BSA}$ の TCA 沈殿性画分 (高分子画分) とほぼ等しく推移し、 $^{111}\text{In-Bz-EDTA-Gal-BSA}$ 投与後血漿中には放射性代謝物が殆ど出現しないことが示唆された。しかし、 $^{125}\text{I-Gal-BSA}$ の総放射活性は投与後 30 分以降 TCA 沈殿性画分よりも高い値で推移し、肝臓をはじめとする組織へ移行後分解により生じた ^{125}I 放射性代謝物が血漿中に一時的に出現することが示唆された。一方、 $^{111}\text{In-DTPA-Gal-BSA}$ の血漿中放射活性濃度は、投与後 5 分までは他の標識体とほぼ等しく推移したものの、血漿中濃度がかなり低くなってからは他の標識体の推移と比較して若干高い値を示した。

Gal-BSA 投与後の放射活性の分布に関して、腎臓、腸 (内容物を含む)、尿、糞を回収した結果を Fig. 4 に示す。いずれの標識体投与時にも投与後初期には腸への分布が認められなかったこと

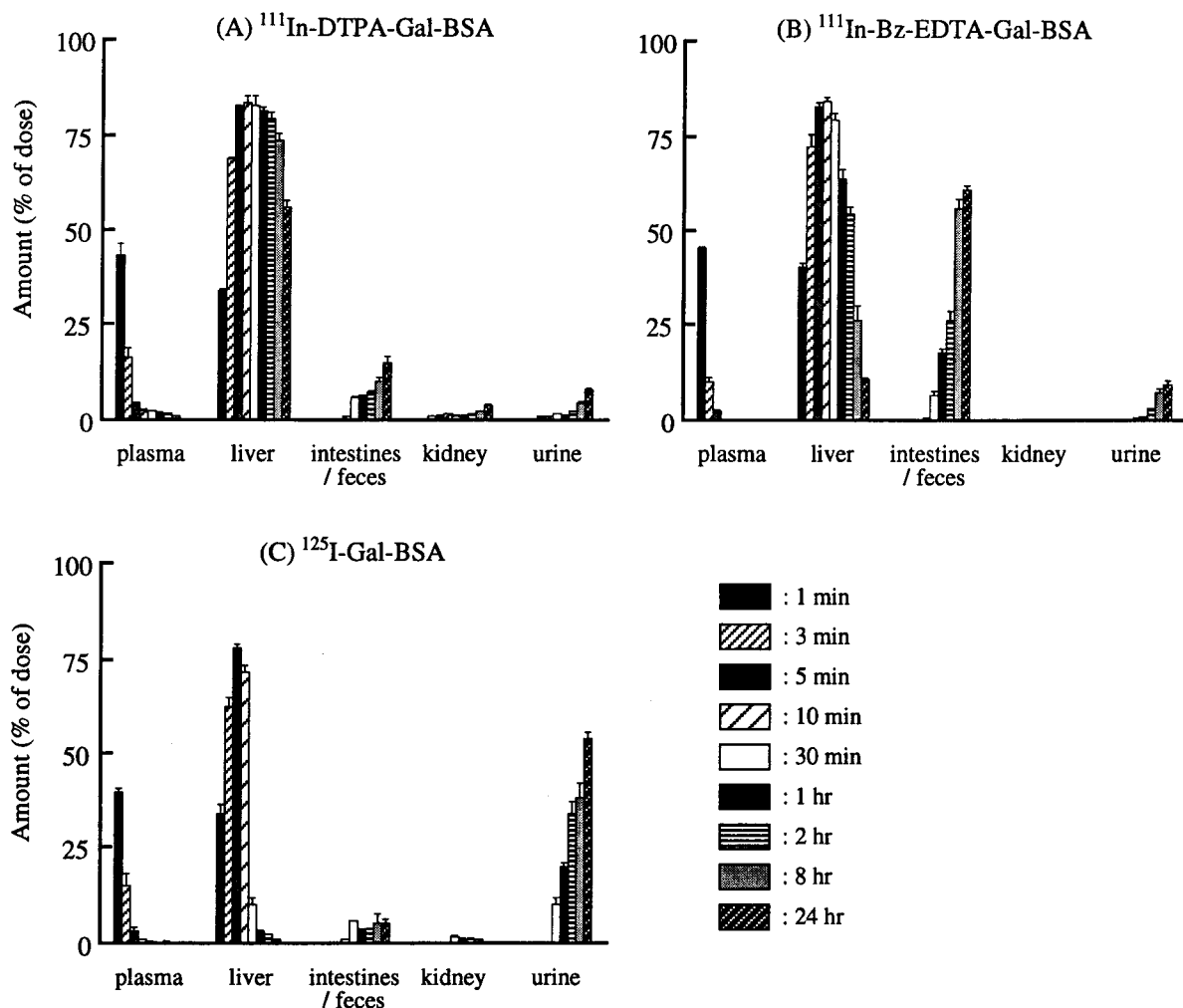


Fig. 4 Tissue distribution and excretion of radioactivities after intravenous injection of radiolabeled Gal-BSA in mice at a dose of 1 mg/kg. Results are expressed as the mean \pm SD of three mice.

から、腸および内容物に存在する放射活性は主に肝臓における代謝により生成した代謝物によるものと仮定し、図には糞中回収量との和の形で表した。 $^{111}\text{In-DTPA-Gal-BSA}$ では、肝臓からの減少分とほぼ対応した量の放射活性が腸および糞中に経時的に回収された。また、腎臓および尿中への移行はかなり低かったものの、投与後初期からわずかながら移行が確認された。 $^{111}\text{In-Bz-EDTA-Gal-BSA}$ の場合も同様に、肝臓中の放射活性の減少に伴い腸および糞中の放射活性が増加した。しかし、腎臓への移行は殆ど認められず、尿中への排泄量も投与量の 10 % 以下であった。一方、 $^{125}\text{I-Gal-BSA}$ 投与時には、腸および糞中には 5 % 程度しか回収されず、投与後 24 時間の時点で 50 % 以上の放射活性が尿中に排泄された。

1-d 体内動態の薬動学的解析

各種高分子の組織移行性は、クリアランスの概念に基づき算出される血漿中濃度に非依存的な組織取り込みクリアランスを用いることにより、直接的かつ定量的に評価できる⁵¹⁻⁵³⁾。

一般に、高分子の組織中量の経時変化は次式のように表される。

$$\frac{dX(t)}{dt} = CL_{in}C(t) - K_{out}X(t) \quad (1)$$

ここで、 $X(t)$ 、 $C(t)$ はそれぞれ時間 t における高分子の組織中量および血漿中濃度、 CL_{in} は見かけの組織取り込みクリアランス、 K_{out} は組織からの efflux 速度定数を表す。組織からの efflux が無視できる場合 ($K_{out} = 0$) には、式 (1) を積分することにより、

$$CL_{in} = \frac{X(tl)}{\int_0^{tl} C(t)dt} = \frac{X(tl)}{AUC_{0-tl}} \quad (2)$$

となり、動物実験により得られたデータから簡便に CL_{in} を求めることが可能となる。ここで、 AUC_{0-tl} は投与直後から時間 tl までの血漿中濃度－時間曲線下面積を示す。この式に従い、各放射標識 Gal-BSA の見かけの肝臓取り込みクリアランス (CL_{liver}) を算出した。各時点までの AUC は、得られた血漿中濃度推移に対して理論式を非線形最小二乗法プログラム MULTI⁵⁴⁾を用いた当てはめ計算から導き、その式を投与直後から各時点まで積分することにより算出した。 $^{125}\text{I-Gal-BSA}$ に関しては、TCA 沈殿性放射活性に対して当てはめ計算を行った。各標識体の血漿中濃度推移は 2 相性を示すものの、 β 相の AUC 全体に及ぼす影響が小さいこと、また β 相出現の時点では血漿中放射活性に占める代謝物の寄与が大きいと考えられることから、血漿中濃度の当てはめ計算には one-compartment open model に基づき誘導される物質収支式を用いた。

Fig. 5 に、式 (2) に従い算出した各時点での CL_{liver} を示した。いずれの放射標識 Gal-BSA 投与時

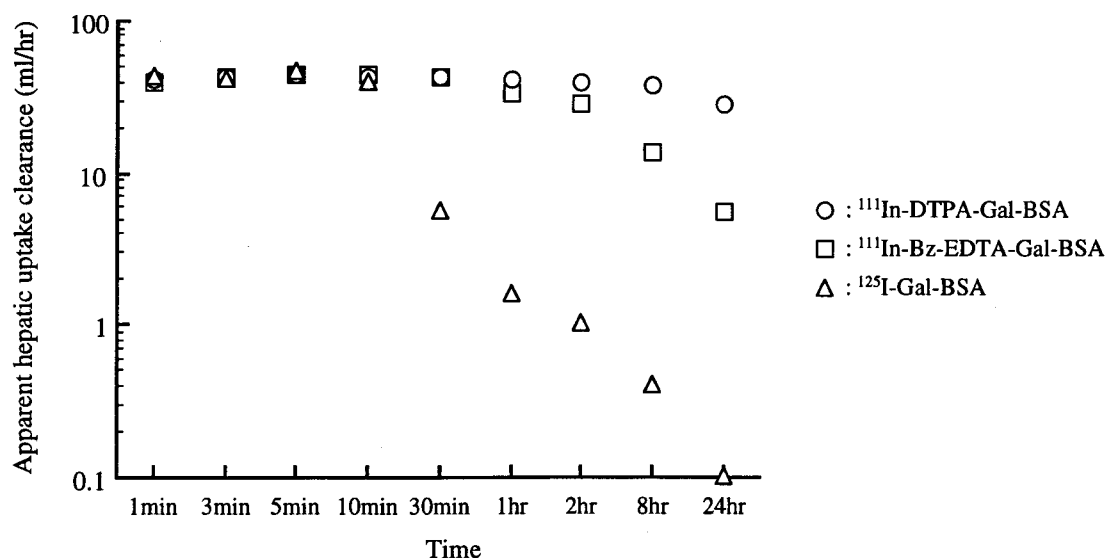


Fig. 5 Apparent hepatic uptake clearance values of radiolabeled Gal-BSA after intravenous injection in mice.

においても投与後 5 分までの時点では CL_{liver} に差は認められず、投与後 5 分の時点で約 45 ml/hr であった。しかしながら、 $^{111}\text{In-DTPA-Gal-BSA}$ 投与時には投与後長時間にわたり CL_{liver} がほぼ一定値として算出されるのに対し、 $^{111}\text{In-Bz-EDTA-Gal-BSA}$ 、 $^{125}\text{I-Gal-BSA}$ では投与後の時間が経過するにつれ CL_{liver} は明らかに小さくなったことから、これら両放射標識法は高分子誘導体の循環血中から組織への取り込み過程を定量的に評価するには適さないことが示された。

一方、組織からの efflux を考慮した場合には、血漿中濃度 (C_p) および肝臓中量 (X_h) はそれぞれ次のように表される。

$$C_p = C_p(0) e^{-k_e t} \quad (3)$$

$$X_h = \frac{C_p(0) CL_{liver}}{k - k_e} (e^{-k_e t} - e^{-kt}) \quad (4)$$

ここで、 $C_p(0)$ は血漿中初期濃度、 k_e 、 k はそれぞれ血漿および肝臓からの一次消失速度定数を表す。血漿中濃度、肝臓中量のデータに対して、式 (3) と (4) とを MULTI を用いて同時当てはめすることからも CL_{liver} は算出でき、その結果 $^{111}\text{In-DTPA-Gal-BSA}$ 、 $^{111}\text{In-Bz-EDTA-Gal-BSA}$ の CL_{liver} はそれぞれ 42.4 ± 4.4 、 41.7 ± 4.9 と求められた。この値は、前述の efflux 過程を無視して算出した場合の投与後初期の値とほぼ等しく、efflux 過程を考慮したモデル解析からも肝臓への取り込みクリアランスを正確に評価できることが示された。また、この時得られる肝臓からの放射活性の消失半減期はそれぞれ、41、5.9 hr となり、各標識体の肝臓移行後の放射活性の減少パターンを反映した値が得られた。しかしながら、 $^{125}\text{I-Gal-BSA}$ の場合には肝臓からの放射活性の消失パターンが 2 相性を示すこともあり、この解析法からはクリアランス値は算出できなかった。また、組織か

らの放射活性の消失は糖修飾高分子の種類や投与量、組織間での代謝・排泄能の違いなどが考えられることから^{55,56)}、糖修飾高分子の組織分布性を評価するには、組織への一方向性の取り込みが仮定できる cDTPA を用いた ¹¹¹In 標識法が適していると考えられる。

以上のことから、以後の糖修飾高分子の体内動態の評価においてタンパク質誘導体とポリアミノ酸誘導体に関しては cDTPA を介する ¹¹¹In 標識体を用い、各組織への移行量をその時点までの AUC で除すことにより見かけの組織取り込みクリアランスを算出し、この値を指標として各誘導体の体内動態特性の定量的評価を行った。

I-2 糖修飾高分子の肝移行動態の解析

前節において、糖修飾高分子の体内動態評価における放射標識法ならびに肝移行動態をはじめとする全身動態の定量的解析法を決定した。そこで本節においては、各種糖修飾を施した BSA をモデル糖修飾高分子として用い、静脈内投与後の糖修飾 BSA の臓器、細胞選択性体内動態について検討した。また、糖修飾高分子のレセプターを介する細胞取り込みは血漿中濃度に依存した非線形な現象であると考えられることから、投与量を変化させて実験を行い、薬動学的解析から糖修飾 BSA の非線形な体内動態特性の評価を試みた⁴⁵⁾。

2-a 糖修飾 BSA の合成およびその物理化学的性質

glucose 修飾 BSA (Glc-BSA)、mannose 修飾 BSA (Man-BSA) は、2-imino-2-methoxyethyl 1-thiogluco-
side、2-imino-2-methoxyethyl 1-thiomannoside をそれぞれ BSA の amino 基と反応させることにより合成した。得られた糖修飾 BSA 1 分子あたりの糖残基数は、Gal-BSA、Glc-BSA、Man-BSA でそれぞれ 21.5、15.3、15.8 個であった。Fig. 6 に、これら糖修飾 BSA の化学構造を示す。以下

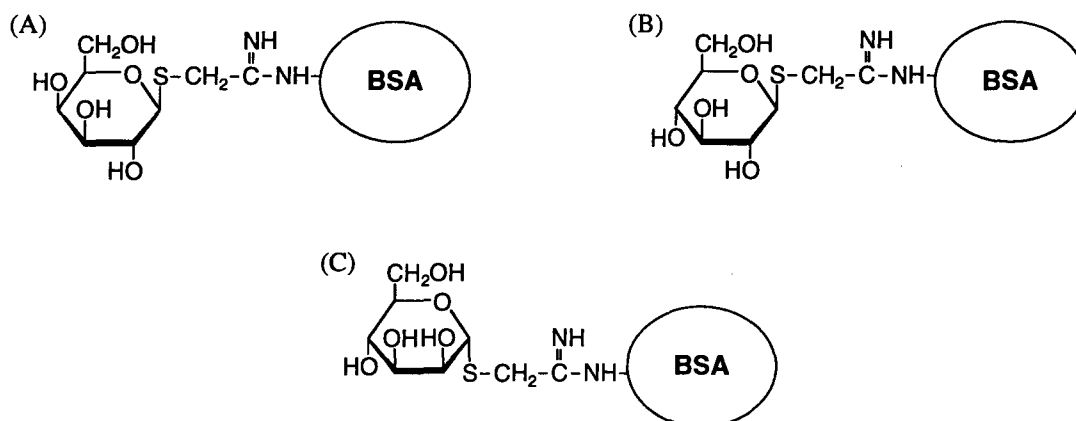


Fig. 6 Chemical structures of glycosylated bovine serum albumins (glycosylated BSAs).
 (A), galactosylated BSA (Gal-BSA); (B), glucosylated BSA (Glc-BSA); (C), mannosylated BSA (Man-BSA).

の実験には、前節でその有用性を明らかにした cDTPA を用いて ^{111}In 標識を施した放射標識体を用いた。

2-b 静脈内投与後の体内挙動

Fig. 7 に、Gal-BSA、Glc-BSA、Man-BSA をそれぞれ 0.05、0.1、1、10、20 mg/kg の投与量でマウスに尾静脈内投与した時の血漿中濃度ならびに肝臓移行量の経時変化を示した。1 mg/kg 以下の投与量で投与した場合、Gal-BSA は血漿中から速やかに消失し、10 分以内に投与量の 70 % 以上が肝臓に回収された。しかし、投与量を 10、20 mg/kg と増加させるに従い、血漿中からの消失および肝臓への移行は遅延した。Glc-BSA の体内挙動は Gal-BSA の場合とほぼ等しく、低投与量時には速やかに血漿中から肝臓へ移行すること、また高投与量時には肝取り込み速度が低下することが明らかとなった。一方、Man-BSA も同様の体内挙動を示したものの、Gal-BSA、Glc-BSA と比較するとその血漿中からの消失および肝臓への取り込みは緩やかであった。また投与後 1 時間

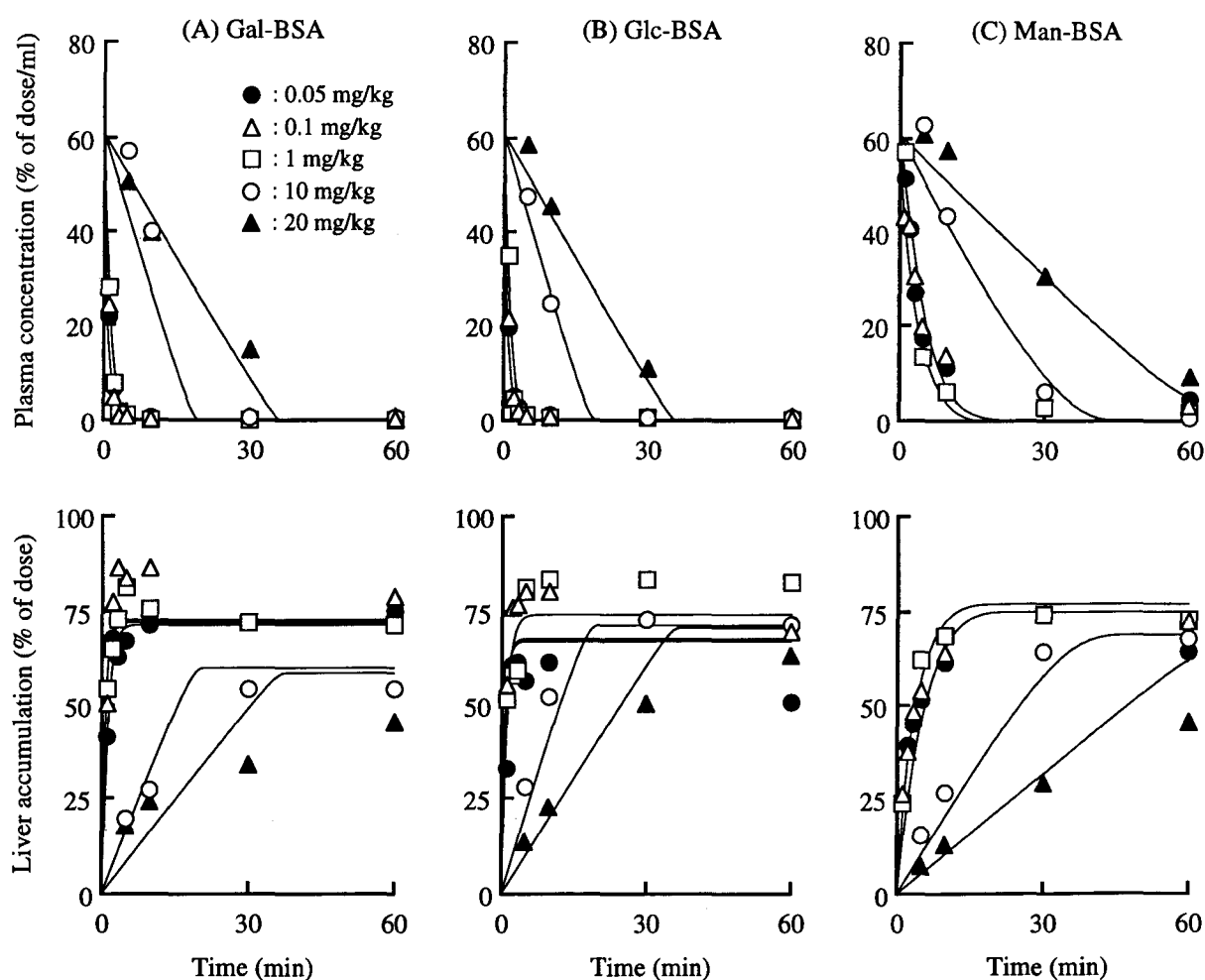


Fig. 7 Plasma concentration (*upper*) and liver accumulation (*lower*) of ^{111}In -labeled glycosylated BSAs after intravenous injection in mice. Results are expressed as the mean of four mice. The curves were simulated using parameters listed in Table III.

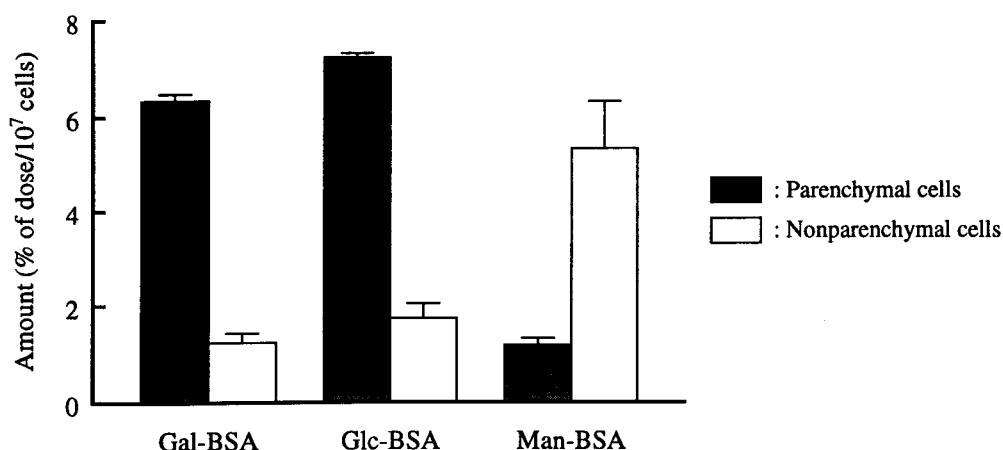


Fig. 8 Recoveries of ^{111}In -labeled glycosylated BSAs in the liver parenchymal and nonparenchymal cells after intravenous injection in mice. Results are expressed as the mean \pm SD of three mice.

までの時点において、Gal-BSA、Glc-BSA の場合には放射活性を測定した肝臓以外の臓器 (腎臓、心臓、肺、脾臓) への移行量は投与量の 0.5 % 以下と非常に低かったのに対して、Man-BSA では投与量の 3~5 % が脾臓へ移行し、この移行量は投与量の上昇に伴い減少する傾向が認められた。

2-c 肝臓構成細胞間での分布

以上の結果、本研究で対象とする糖修飾 BSA が肝臓へ特異的に取り込まれることが明らかとなった。肝臓は実質細胞と Kupffer 細胞および血管内皮細胞を含む非実質細胞には、それぞれ galactose あるいは mannose を末端に持つ糖鎖を特異的に認識して糖タンパク質を取り込むレセプターの存在が知られている^{1,2,57)}。そこで各糖修飾 BSA の肝臓取り込みの実体を明確にするため、各肝臓構成細胞への分布特性を評価した。糖修飾 BSA を 1 mg/kg の投与量で投与したマウスの肝臓を collagenase を含む緩衝液で灌流し、得られた細胞懸濁液を遠心分離することにより実質細胞と非実質細胞とに分離し⁵⁸⁾、各細胞中放射活性を測定した。Fig. 8 に細胞数あたりの両細胞画分への糖修飾 BSA の回収量を示した。Gal-BSA はアシアロ糖タンパク質レセプターの存在する実質細胞に、一方 Man-BSA はマンノースレセプターの存在する非実質細胞による取り込みが高いことが示された。また Glc-BSA は、Gal-BSA 同様実質細胞による取り込みが顕著であった。

さらに、糖修飾 BSA の肝臓取り込み過程における糖特異性を明らかにするために、2 種類の糖修飾 BSA の同時投与実験を行い、 ^{111}In 標識糖修飾 BSA の血漿中からの減少および肝臓による取り込みに及ぼす異種の非標識糖修飾 BSA の影響について検討した。Table I は同時投与時の ^{111}In 標識体の血漿中濃度と肝臓移行量を単独投与時の結果とともにまとめたものである。Gal-BSA と Man-BSA とを同時投与した場合には、共存する非標識体は ^{111}In 標識体の体内動態に対して全く影響を与えないことが明らかとなり、これら両修飾体の肝臓における取り込み現象は互いに独立していることが確認された。一方、Glc-BSA と Gal-BSA とを投与した場合には、 ^{111}In 標識体の血漿

Table I Plasma concentration and liver accumulation of ^{111}In -labeled glycosylated BSAs after intravenous injection in mice with other glycosylated BSA

Compound	Inhibitor	Plasma concentration (% of dose/ml)	Liver accumulation (% of dose)
Gal-BSA	none	0.88 \pm 0.27 ^{a)}	81.1 \pm 3.0
	Glc-BSA	26.8 \pm 4.4 *	58.6 \pm 1.5 *
	Man-BSA	0.37 \pm 0.05	75.2 \pm 2.9
Glc-BSA	none	1.12 \pm 0.20	80.9 \pm 5.1
	Gal-BSA	25.8 \pm 1.5 *	49.5 \pm 2.5 *
Man-BSA	none	6.22 \pm 1.01	59.2 \pm 2.4
	Gal-BSA	8.24 \pm 1.50	61.1 \pm 2.9
	Glc-BSA	20.3 \pm 4.7 *	51.4 \pm 2.8

^{111}In -labeled glycosylated BSA (1 mg/kg) was injected with other BSA derivative (10 mg/kg), and plasma concentration and liver accumulation were compared at 5 min for Gal-BSA and Glc-BSA or at 10 min for Man-BSA after injection.

^{a)} Results are expressed as the mean \pm SD of at least three mice.

* Statistically significant difference based on Student *t*-test ($P < 0.01$) as compared with each control.

中からの消失および肝臓による取り込みは非標識体の同時投与により有意に抑制され、これら両糖修飾 BSA は同一の機構により取り込まれることが示唆された。本研究で採用した方法で合成した Glc-BSA は imino 基部分が正電荷を持つことによりアシアロ糖タンパク質レセプターに認識されるという報告⁵⁹⁾があり、この同時投与実験の結果は *in vivo* においても Glc-BSA がこのレセプターを介して肝臓に取り込まれていることを示唆するものと思われる。しかし、Glc-BSA は Man-BSA の血漿からの消失をも有意に抑制したことから、高濃度時には肝臓をはじめとする種々の組織による Man-BSA の取り込み機構を部分的に阻害する可能性が示唆された。

2-d *in vivo* 体内動態特性の評価法

以上の結果から、本研究で対象とする糖修飾 BSA が効率よく肝臓の実質細胞あるいは非実質細胞へ選択的に移行することが明らかとなった一方で、その肝臓取り込みが投与量の増加と共に低下することが示された。そこで、これら糖修飾 BSA の体内動態特性を明らかにするために、前節と同様の方法により AUC および CL_{in} を求め、糖修飾 BSA の体内動態の定量的評価を行った。また、全身クリアランス (CL_{total}) を次式に従い算出した。

$$\text{CL}_{\text{total}} = \frac{\text{dose}}{\text{AUC}_{\infty}} \quad (5)$$

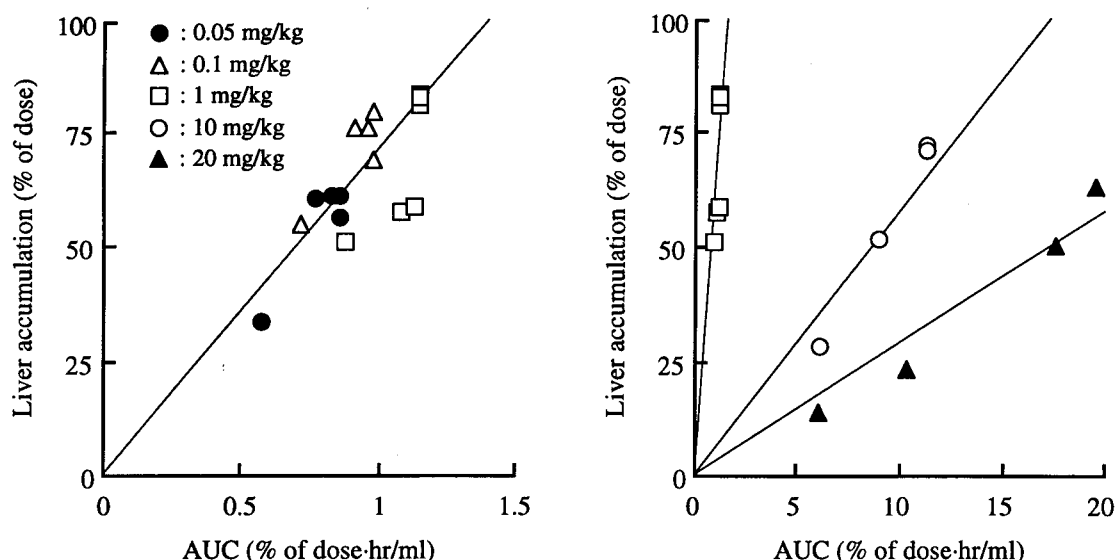


Fig. 9 Relationship between the amounts accumulated in the liver and AUC of ^{111}In -labeled Glc-BSA after intravenous injection in mice. Results are expressed as the mean of four mice.

ここで、 AUC_{∞} は投与直後から無限時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積である。

Fig. 9 に Glc-BSA の各時点における肝臓中量をその時点までの AUC に対してプロットした。投与量が 1 mg/kg 以下の場合、肝臓中量は AUC の増加に伴い直線的に増加しており、この解析法により CL_{liver} を定量的に算出可能であることが示された。また、投与量が 10 mg/kg、20 mg/kg の場合にも同様に解析可能であることが示された (Fig. 9B)。しかし、投与量が高い場合には時間

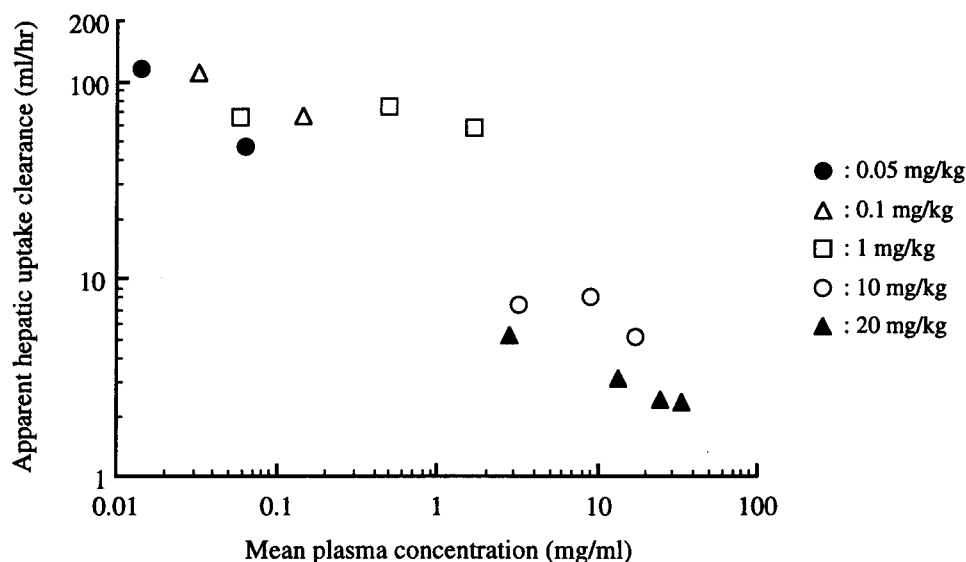


Fig. 10 Effect of the plasma concentration of ^{111}In -labeled Glc-BSA on its apparent hepatic uptake clearance after intravenous injection in mice at various doses. The apparent hepatic uptake clearances of ^{111}In -labeled Glc-BSA at any time point after injection were calculated and plotted against the mean plasma concentration between the sampling points.

の経過に伴い若干傾きが大きくなる傾向が認められたことから、血漿中濃度の減少と共に CL_{liver} が増大していることが示唆された。このことを確認するため、全ての投与量の Glc-BSA に関して各測定点間の平均血漿中濃度と CL_{liver} との関係を整理した結果 (Fig. 10)、 CL_{liver} は血漿中濃度に依存した値であることが示された。この結果は、epidermal growth factor などの細胞取り込みにおいて報告⁶⁰⁻⁶³⁾されている細胞表面レセプターの down regulation による取り込みの低下は、本研究で対象とする糖修飾高分子の取り込みにおいては無視可能であることを示唆するものである。

この down regulation に関して Gal-BSA を用いて若干の検討を行った。非標識 Gal-BSA を 10 mg/kg の投与量で投与したマウスに対し、一定時間経過後に tracer 量 (約 0.03 mg/kg) の ^{111}In -Gal-BSA を投与し、その標識体の血漿中濃度および肝臓移行量を追跡した。Fig. 11 には、各条件下での ^{111}In -Gal-BSA の血漿中濃度と肝臓移行量の経時変化を、非標識体を投与した時点を基準にして示した。非標識体と同時投与した場合 (約 10 mg/kg 投与に相当) には血漿からの消失ならびに肝臓への移行は緩やかであったものの、非標識体を投与してから標識体を投与するまでの間隔を 20 分、40 分と延長するにつれて ^{111}In -Gal-BSA の肝臓への移行は速やかとなった。Fig. 12 には、標識体を投与した時点を基準にして各条件下での ^{111}In -Gal-BSA の血漿中濃度と肝臓移行量の経時変化を示した。非標識体を 10 mg/kg で投与後 40 分の時点で投与した tracer 量の ^{111}In -Gal-BSA は、tracer 量のみを投与した場合とほぼ等しい血漿中濃度および肝臓移行量を示した。また、非標識体を投与後 tracer 量の標識体を投与する際再度非標識体を 10 mg/kg の投与量で同時投与した場合の肝移行動態は、最初投与する際に同時に投与した結果とほぼ一致した。これらの結果から、本研究で取り扱う範囲の糖修飾高分子の肝臓による取り込みに関してはレセプターの down regulation は無視

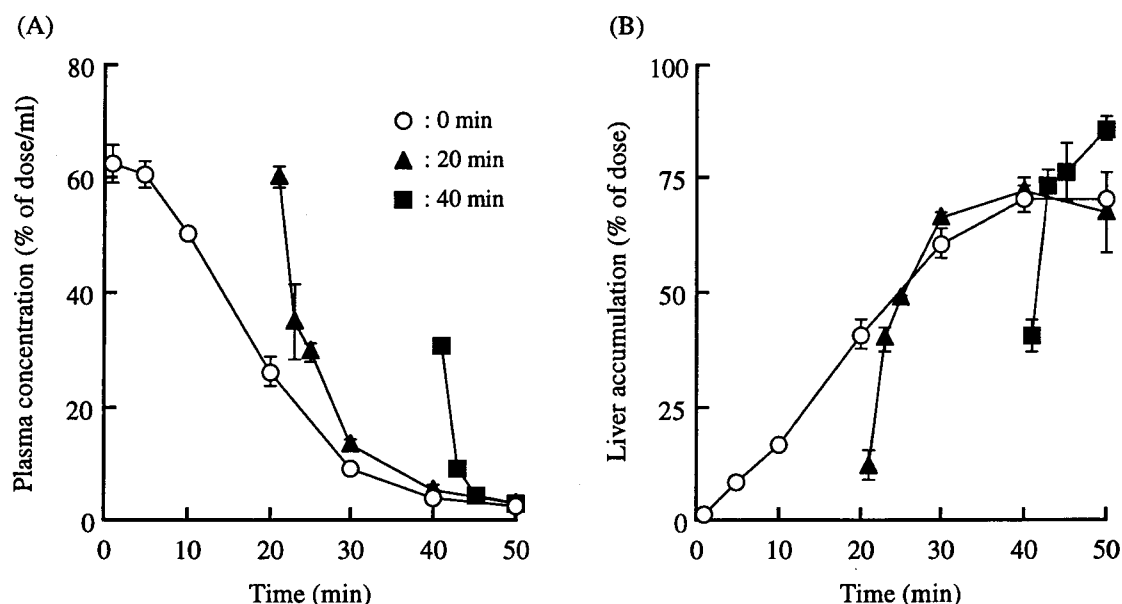


Fig. 11 Effect of the administration of unlabeled Gal-BSA on the plasma concentration (A) and liver accumulation (B) of ^{111}In -labeled Gal-BSA. A tracer dose of ^{111}In -labeled Gal-BSA was injected in mice at 0, 20, or 40 min postinjection of 10 mg/kg dose of unlabeled Gal-BSA. The abscissas indicate the time after the injection of unlabeled Gal-BSA. Results are expressed as the mean \pm SD of three mice.

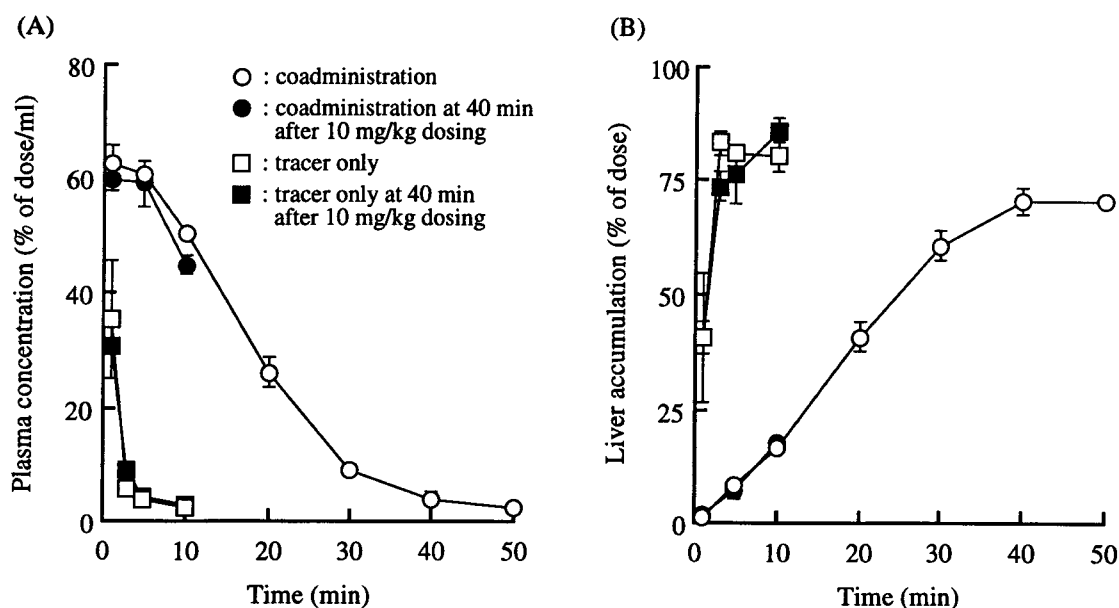


Fig. 12 Effect of the coinjection of unlabeled Gal-BSA on the plasma concentration (A) and liver accumulation (B) of ^{111}In -labeled Gal-BSA. A tracer dose of ^{111}In -labeled Gal-BSA was injected in mice with or without 10 mg/kg dose of Gal-BSA, or was injected at 40 min postinjection of 10 mg/kg dose of Gal-BSA with or without 10 mg/kg dose of Gal-BSA. The abscissas indicate the time after the injection of ^{111}In -labeled Gal-BSA. Results are expressed as the mean \pm SD of three mice.

できること、さらには糖修飾高分子を薬物またはキャリアーとして利用する際に連続投与が可能であることが示唆された。

2-e 糖修飾 BSA の体内動態の薬動学的解析

以上の結果から、糖修飾 BSA の肝臓取り込みは CL_{liver} を用いて定量的に評価できることが示された。しかし、投与条件によっては時間の経過に伴い変化することが示されたことから、各投与条件での包括的なクリアランスの値として投与した誘導体が血漿中からほぼ完全に消失した時点で各組織の CL_{in} を式 (2) に従い算出し、この値を各誘導体の体内動態特性を表す指標として用いた。

Table II は糖修飾 BSA の薬動学パラメータをまとめたものである。各組織への移行性を比較するため、単位重量あたりの見かけの組織取り込みクリアランスも併せて算出し、組織取り込み速度 (tissue uptake rate index) として示した。また、 CL_{total} と CL_{liver} の差を肝外クリアランス (CL_{other}) とし、肝臓以外への消失の指標とした。いずれの糖修飾 BSA の場合にも CL_{liver} が CL_{total} の大部分を占めており、いずれの糖修飾体も極めて高い肝指向性を有することが明らかとなった。また、投与量が 1 mg/kg 以上の場合には顕著な CL_{liver} の低下が認められた。Gal-BSA および Glc-BSA では、1 mg/kg 以下の投与量時の CL_{liver} は非常に大きく、また投与量に依らずほぼ一定値となった。この時の CL_{liver} は文献⁶⁴⁾をもとに算出した体重 25 g のマウスでの肝臓の血漿流速 (85 ml/hr) とほぼ

Table II AUC and clearances of ^{111}In -labeled glycosylated BSAs after intravenous injection in mice

Compound	Dose (mg/kg)	AUC (% of dose · hr/ml)	Clearance (ml/hr)				Tissue uptake rate index (ml/hr/g)			
			CL _{total}	CL _{liver}	CL _{other} ^{a)}	CL _{urine}	Liver	Spleen	Kidney	Muscle
Gal-BSA	0.05	0.97	103	72.7	30.3	0.52	65.3	n.d. ^{b)}	n.d.	n.d.
	0.1	1.03	97.1	82.4	13.7	0.12	60.0	0.11	0.86	0.10
	1	1.34	74.6	56.7	17.9	0.57	30.2	0.08	0.50	0.06
	10	19.1	5.24	3.22	2.02	0.05	2.09	0.03	0.10	0.02
	20	20.6	4.86	2.38	2.48	0.02	2.13	n.d.	n.d.	n.d.
Glc-BSA	0.05	0.91	110	65.0	45.0	0.38	60.9	n.d.	n.d.	n.d.
	0.1	0.95	105	84.7	20.3	0.17	62.5	1.60	0.79	0.09
	1	1.62	61.7	51.5	10.2	0.39	31.5	1.03	0.31	0.06
	10	11.8	8.46	6.11	2.35	0.41	4.55	0.41	0.12	0.02
	20	21.9	4.56	2.67	1.89	0.02	2.44	n.d.	n.d.	n.d.
Man-BSA	0.05	3.36	27.3	18.0	9.30	0.36	17.7	9.45	n.d.	n.d.
	0.1	3.67	27.2	19.3	7.90	0.10	11.3	5.93	0.30	0.02
	1	3.98	25.1	19.2	5.90	0.13	16.0	7.97	0.46	0.03
	10	24.8	4.04	3.20	0.84	0.04	2.71	1.32	0.11	0.01
	20	41.1	2.43	1.30	1.13	0.01	1.17	0.75	n.d.	n.d.

^{a)} CL_{other} was calculated by subtracting CL_{liver} from CL_{total}.

^{b)} Not determined.

等しいことから、これら両誘導体は肝臓一回通過の間にほぼすべてが取り込まれることが示された。

尿中排泄クリアランス (CL_{urine}) および腎臓、筋肉による取り込み速度は、いずれの誘導体の場合にも小さく、また誘導体間で大きな違いは見られなかった。しかし、脾臓による取り込み速度には各糖修飾 BSA 間で違いが見られ、Man-BSA では肝臓の取り込み速度の 49~64 % と比較的高い値を示した。さらに、この脾臓による取り込み速度は投与量の増加に伴い低下したことから、脾臓にも Man-BSA を特異的に認識する機構が存在することが示唆された。mannose を認識するレセプターは、Kupffer 細胞、肝臓血管内皮細胞以外にも各種マクロファージ等の細胞にも発現していることが知られており^{65,66)}、Man-BSA の脾臓への取り込みにもこうした細胞が関与していることが示唆された。しかしながら、脾臓重量は小さいため Man-BSA の見かけの脾臓取り込みクリアランスは肝臓と比較して 1/14~1/50 程度であり、脾臓による取り込みは Man-BSA の全身挙動にはそれほど影響しないものと考えられる。一方、肝臓以外への消失全体の特性を CL_{other} を用いて評価した場合には、すべての糖修飾 BSA において CL_{other} は投与量の増大に伴い減少したことから、Man-BSA の脾臓取り込みに見られたような何らかの濃度依存的な過程が Gal-BSA および Glc-BSA の肝臓以外への消失にも存在することが示唆された。

I-3 生理学的薬動学モデルに基づく糖修飾 BSA の非線形肝移行動態の解析

前節において、糖修飾 BSA が肝臓の実質細胞あるいは非実質細胞に特異的に移行すること、またその肝臓による取り込み現象は投与量に依存していることを薬動学的解析を通じて明らかにした。本節では糖修飾 BSA の肝臓移行動態を投与量に依存しない形で数値化するため、糖修飾 BSA の体内動態を記述する生理学的薬動学モデルを構築し、このモデルに基づき解析を行った。

3-a 生理学的薬動学モデルの構築

Fig. 13 に糖修飾 BSA の体内動態を解析するために構築した生理学的薬動学モデルを示した。肝臓による糖修飾 BSA の取り込みは肝臓のシヌソイドおよび Disse 腔を表す extracellular space (EC) から肝臓構成細胞の細胞内スペースを表す intracellular space (IC) への移行により表されるものとした。この肝臓取り込み過程は血漿中濃度に依存した速度を示すこと、またレセプター数の変化を無視できることから、Michaelis-Menten 型であると仮定した。また、低投与量の場合には糖修飾 BSA の肝臓による取り込みの律速段階が肝臓への血漿流速であることを考慮し、糖修飾 BSA は肝臓以外の組織の血漿スペースおよび血管内を表す plasma pool (PP) から肝臓取り込みが起こる EC へ血漿流で運ばれると仮定した。さらに、PP からの肝臓以外への消失に関しても Table II で示した CL_{other} が投与量に依存した値となることから、肝臓取り込み過程同様 Michaelis-Menten 型であ

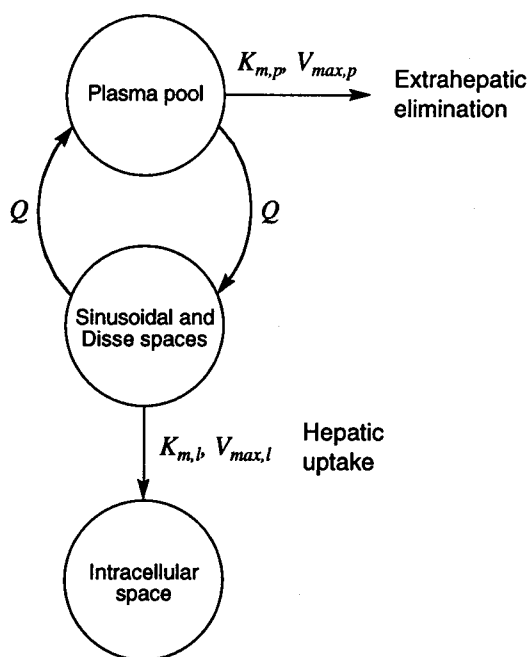


Fig. 13 Physiological pharmacokinetic model for analyzing the *in vivo* disposition of macromolecules. $K_{m,l}$ and $V_{max,l}$, Michaelis constant and the maximum rate for liver uptake, respectively. $K_{m,p}$ and $V_{max,p}$, Michaelis constant and the maximum rate for extrahepatic elimination, respectively. Q , hepatic plasma flow rate.

ると仮定した。各コンパートメントに関する物質収支式は以下のように記述できる。

$$\frac{dC_p}{dt} = (QC_i - QC_p - \frac{V_{max,p}}{K_{m,p} + C_p} C_p) / V_p \quad (7)$$

$$\frac{dC_i}{dt} = (QC_p - QC_i - \frac{V_{max,i}}{K_{m,i} + C_i} C_i) / V_i \quad (8)$$

$$\frac{dX_i}{dt} = \frac{V_{max,i}}{K_{m,i} + C_i} C_i \quad (9)$$

ここで、 C_p 、 C_i はそれぞれ PP および EC 中濃度、 X_i は IC 中への移行量を表す。また、 $K_{m,p}$ 、 $V_{max,p}$ 、 $K_{m,i}$ 、 $V_{max,i}$ はそれぞれ PP および EC の Michaelis-Menten 型移行過程の Michaelis 定数 ($K_{m,p}$ 、 $K_{m,i}$) および最大取り込み速度 ($V_{max,p}$ 、 $V_{max,i}$) である。 Q 、 V_p 、 V_i はそれぞれ肝血漿流速、PP および EC の分布容積であり、文献⁶⁴⁾からそれぞれ 85 ml/hr、1.5 ml、0.15 ml とした。初期条件として投与された糖修飾 BSA は PP および EC に瞬時に同濃度で分布すると仮定し、式 (7) ~ (9) を Runge-Kutta-Gill 法による数値解析を組み込んだ非線形最小二乗法プログラム MULTI(RUNGE)⁶⁷⁾を用いて Fig. 7 に示す糖修飾 BSA のすべての投与量での血漿中濃度 (C_p) および肝臓移行量 (X_i) に対して同時当てはめ計算を行い、 $K_{m,p}$ 、 $V_{max,p}$ 、 $K_{m,i}$ 、 $V_{max,i}$ を算出した。

肝取り込み過程のパラメータ ($K_{m,i}$ 、 $V_{max,i}$) の初期値は以下のように見積もった。肝取り込み過程が飽和した場合 ($C_i \gg K_{m,i}$)、式 (9) は次式に変換できる。

$$\frac{dX_i}{dt} = V_{max,i} \quad (10)$$

式 (10) を投与直後から時間 t まで積分すると、

$$X_i(t) = V_{max,i} t \quad (11)$$

となる。ここで、 $X_i(t)$ は時間 t における肝臓移行量である。従って、 $V_{max,i}$ の初期値は投与量が高い場合 (10 あるいは 20 mg/kg) の投与後初期の肝臓移行量を時間に対してプロットした時の傾きから推定した。一方、EC 中の濃度が $K_{m,i}$ と比較して十分小さい場合 ($C_i \ll K_{m,i}$) には、式 (9) から次式が得られる。

$$\frac{dX_i}{dt} = \frac{V_{max,i}}{K_{m,i}} C_i \quad (12)$$

$$= CL_{int,liver} C_i \quad (13)$$

となる。ここで、 $CL_{int,liver}$ は肝血漿流速 (Q) に依存しない肝臓の固有取り込みクリアランスであり、 $V_{max,l}/K_{m,l}$ で表される。先ほどと同様にして式 (13) を投与直後から時間 t まで積分すると、

$$X_l(t) = CL_{int,liver} AUC_{0-t} \quad (14)$$

となる。従って、血漿中濃度が $K_{m,l}$ と比較して非常に低い条件下、肝臓への移行量をその時点までの AUC に対してプロットした時の傾きと、式 (11) から見積もられる $V_{max,l}$ を用いることにより $K_{m,l}$ は推定できることになる。しかし、糖修飾 BSA の 1 mg/kg 以下の投与量条件での CL_{liver} は肝血漿流速を無視できないくらい大きな値であることから、次式に示される Q 、 $CL_{int,liver}$ 、 CL_{liver} の関係から $K_{m,l}$ の初期値を推定した。

$$CL_{int,liver} = \frac{Q CL_{liver}}{Q - CL_{liver}} \quad (15)$$

肝臓以外への消失過程のパラメータ ($K_{m,p}$ 、 $V_{max,p}$) に関しては式 (11)、(14) を用い、投与量から血漿中量および肝臓移行量を差し引いた値を各時間までの移行量として初期値の推定を行った。

3-b モデルに基づくパラメータの算出

Table III に当てはめ計算により得られた薬動学パラメータを整理した。このパラメータより計算された種々の投与量での血漿中濃度および肝臓移行量の経時変化を表す simulation curve を Fig. 7 に示した。いずれの糖修飾 BSA の場合においても、理論曲線は実験結果をよく反映しており、本モデルにより糖修飾 BSA の体内挙動を評価可能であることが示された。Gal-BSA および Glc-BSA では、 $K_{m,l}$ は非常に小さな値となり、これらが非常に高い affinity でレセプターに認識され、肝臓

Table III Pharmacokinetic parameters of ^{111}In -labeled glycosylated BSAs

Compound	Liver			Plasma		
	$K_{m,l}$ (nM)	$V_{max,l}$ (nmol/hr)	$V_{max,l}/K_{m,l}$ (ml/hr)	$K_{m,p}$ (nM)	$V_{max,p}$ (nmol/hr)	$V_{max,p}/K_{m,p}$ (ml/hr)
Gal-BSA	4.47 ± 0.25	7.09 ± 0.38	1,590	160 ± 45	5.78 ± 0.97	36.2
Glc-BSA	5.53 ± 0.03	8.81 ± 0.44	1,590	80.7 ± 1.7	3.93 ± 0.45	48.7
Man-BSA	179 ± 27	4.99 ± 0.46	27.9	430 ± 207	2.83 ± 0.85	6.57

Each parameter was calculated based on the model (Fig. 13) and was obtained by fitting the differential equations (7)-(9) to experimental data of plasma concentration and liver accumulation time courses of each ^{111}In -labeled glycosylated BSA at five doses. $K_{m,l}$ and $V_{max,l}$, Michaelis constant and the maximum rate for liver uptake, respectively. $K_{m,p}$ and $V_{max,p}$, Michaelis constant and the maximum rate for extrahepatic elimination, respectively.

に取り込まれることが示唆された。また、 $CL_{int,liver} (V_{max,l}/K_{m,l})$ はどちらも約 1,600 ml/hr と算出され、肝血漿流速 (85 ml/hr) と比較して非常に大きいことが示された。一方、Man-BSA の $K_{m,l}$ は Gal-BSA、Glc-BSA の場合の約 30~40 倍となり、これらとの比較においては肝臓取り込み過程の affinity はそれほど高くないことが示されたものの、肝臓以外への消失過程の $K_{m,p}$ と比較すると 1/2 以下であり、Man-BSA に関しても肝臓取り込みの affinity がより高いことが示された。またすべての糖修飾 BSA に関して、 $CL_{int,liver}$ は肝臓以外への消失過程の値 ($V_{max,p}/K_{m,p}$) の約 4.3~44 倍と大きく、肝臓による糖修飾 BSA の取り込み能が非常に高いことが示された。

I-4 dextran 体内動態への生理学的薬動学モデル解析の適用

構築した生理学的速度論モデルに基づく動態解析は、糖修飾 BSA のみならず他の飽和性の肝臓取り込みを受ける化合物にも適用可能であると考えられる。血漿増量剤としての臨床実績もあり、また低分子薬物^{51,68-81)}や生理活性タンパク質⁸²⁻⁸⁷⁾の体内動態を改善する修飾素材としても汎用される dextran は、分子量に依存した体内動態を示し、分子量が数万以上の dextran は高投与量時には比較的長時間血中に滞留するものの時間の経過とともに肝臓をはじめとする種々の臓器に取り込まれることが報告されている⁸⁸⁻⁹¹⁾。また、dextran を用いて uricase を修飾した場合には肝臓による取り込みが増加することも報告されている⁸³⁾。筆者は薬物キャリアーとしての dextran の利用を考え、その体内動態を検討した結果 dextran が肝臓に効率よく取り込まれること、またその肝臓取り込みが投与量の増加に従い減少することを見いだした⁹²⁾。そこで、先ず dextran の体内動態を検討し、その結果得られた投与量依存的な体内動態に対して前節で構築したモデル解析の応用を試みた。

4-a dextran の放射標識体の合成および体内挙動

dextran (平均分子量約 70,000) の放射標識は、Isbell らの方法⁹³⁾に従い、還元末端の aldehyde 基に [^{14}C]KCN を反応させることにより dextran の ^{14}C 標識体 ([carboxyl- ^{14}C]-dextran) を合成した。

dextran を投与量 1、10、100 mg/kg でマウスに投与した後の血漿中濃度ならびに肝臓移行量を Fig. 14 に示す。投与量が 10 および 100 mg/kg の場合には、同じ平均分子量の非標識 dextran を用いて濃度を調製後マウスに投与した。1 mg/kg で投与した場合、dextran は比較的速やかに血漿中より消失し、1 時間までに投与量の 60 % 以上が肝臓中に回収された。しかし、この肝臓への移行は投与量の増加に伴い遅延かつ減少したことから、肝臓による dextran の取り込みは濃度依存的な現象であることが明らかとなった。一方、尿中への排泄量は投与量の増加に伴い増加した (Fig. 15)。肝臓中および尿中に回収された放射活性の和はいずれの場合にも投与量の 89~98 % と高く、dextran の体内動態は肝臓への取り込みと尿中排泄により決定されることが示された。

第 I 章 2 節と同様の方法で肝臓の実質細胞、非実質細胞間での dextran の分布性について検討を

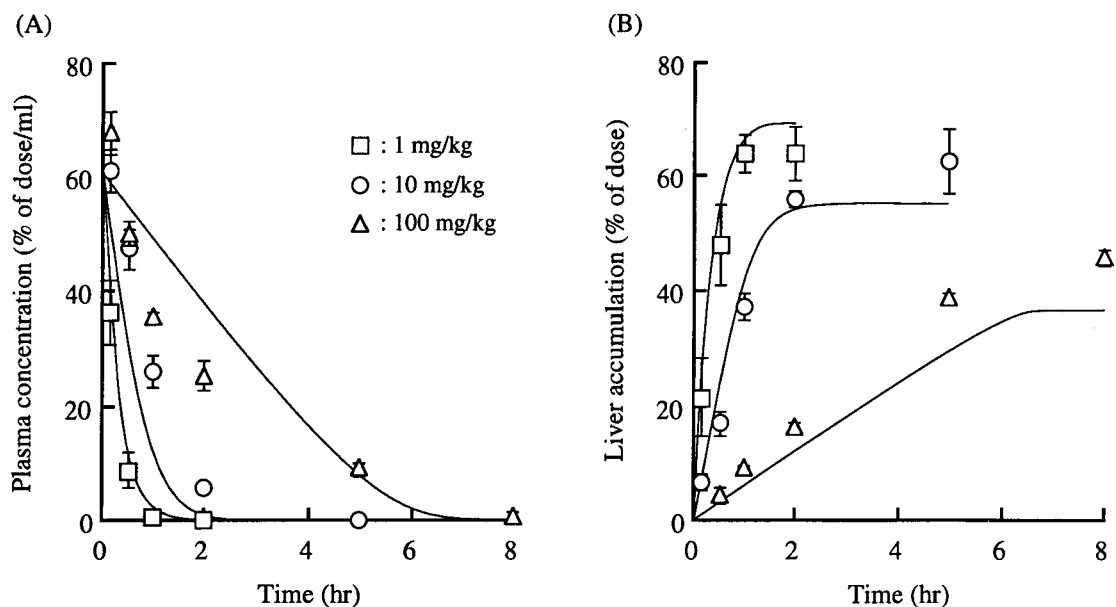


Fig. 14 Plasma concentration (A) and liver accumulation (B) of ^{14}C -labeled dextran after intravenous injection in mice. Results are expressed as the mean \pm SD of four mice. The curves were simulated using parameters listed in Table V.

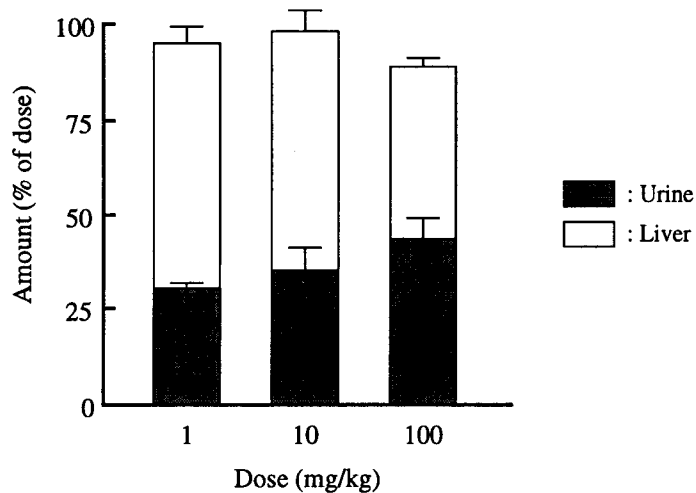


Fig. 15 Urinary excretion and liver accumulation of ^{14}C -labeled dextran after intravenous injection in mice. The amounts of ^{14}C -labeled dextran at 2, 5, or 8 hr postinjection at a dose of 1, 10, or 100 mg/kg, respectively, are expressed as the mean \pm SD of four mice.

行った。1 mg/kg の投与量で投与 1 時間後における各細胞への回収量は、実質細胞で 10^7 個細胞あたり 4.8 %、非実質細胞で 1.2 % となり、選択的に肝臓の実質細胞に取り込まれることが明らかとなった。

4-b Gal-BSA との同時投与時の体内挙動

前節において、dextran は投与量依存的に肝臓に取り込まれること、またその取り込みは主に実質細胞によるものであることが明らかとなった。そこで dextran の取り込み機構に関して若干の考察を加えるため、Gal-BSA を dextran と同時投与し、dextran の肝臓取り込みにおけるアシアロ糖タンパク質レセプターの寄与について検討した。Fig. 16 に、dextran と Gal-BSA をマウスにそれぞれ 1、30 mg/kg の投与量で同時投与したときの dextran の血漿中濃度および肝臓移行量の経時変化を、対照として dextran 単独投与時の結果とともに示す。Gal-BSA との同時投与により、dextran の血漿中からの消失は明らかに遅延した。また、肝臓へは投与後 30 分までは殆ど取り込まれず、投与 2 時間後の分布がほぼ完了した時点においても対照群の半分以下 (投与量の約 30 %) しか取り込まれなかった。以上のことから、dextran の肝臓取り込みが Gal-BSA により阻害されることが示され、dextran がアシアロ糖タンパク質レセプターを介して肝細胞に取り込まれる可能性が示された。

4-c 体内動態の薬動的解析

^{14}C 標識 dextran の組織中での分解性は極めて低いこと⁹⁴⁾、また検討した時間範囲 (1、10、100 mg/kg 投与時それぞれ 2、5、8 時間) において、肝臓中放射活性量の減少は見られなかったことから、第 I 章 2 節と同様の方法で AUC、 CL_{total} 、 CL_{liver} 、 CL_{urine} および各組織取り込み速度を算出し、Table IV に整理した。 CL_{liver} は投与量の増加に伴い顕著に減少し、また CL_{urine} も同様に減少するこ

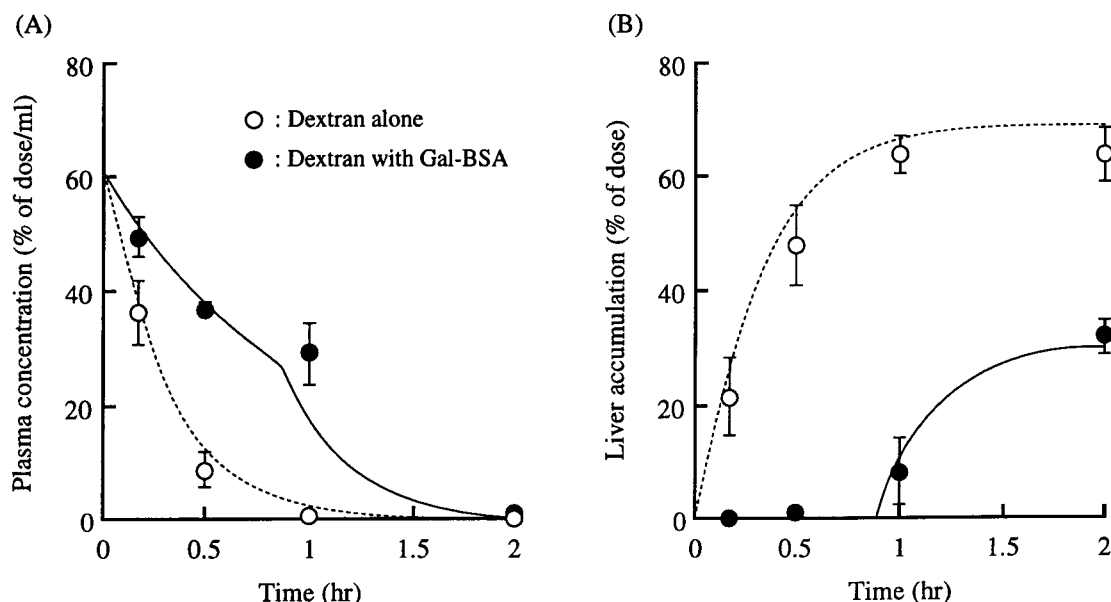


Fig. 16 Plasma concentration (A) and liver accumulation (B) of ^{14}C -labeled dextran after intravenous injection in mice coadministered with Gal-BSA. ^{14}C -labeled dextran (1 mg/kg) was simultaneously injected with Gal-BSA (30 mg/kg). Results are expressed as the mean \pm SD of four mice. The curves were simulated using parameters listed in Table III and V.

Table IV AUC and clearances of ^{14}C -labeled dextran after intravenous injection in mice

Dose (mg/kg)	AUC (% of dose ·hr/ml)	Clearance (ml/hr)			Tissue uptake rate index (ml/hr/g)			
		CL_{total}	CL_{liver}	CL_{urine}	Liver	Spleen	Kidney	Muscle
1	17.2	5.81	3.73	1.74	2.65	0.035	0.031	0.009
10	69.4	1.44	0.906	0.412	0.749	0.017	0.015	0.007
100	149	0.673	0.323	0.293	0.257	0.015	0.008	0.005

とが示された。dextran は糸球体濾過を受け尿中に排泄されることが明らかにされており⁹⁵⁾、分子半径が 20 Å 以下の dextran は制限を受けることなく速やかに糸球体濾過されること⁹⁶⁾、一方では分子量が大きくなるにつれてこの濾過過程は制限されるようになり分子半径が 50 Å 以上になると殆ど濾過されなくなることが報告されている⁹⁷⁾。また、血漿中に残存する dextran の分子量分布は投与後時間の経過とともに高分子側にシフトするという報告⁹⁸⁾もあり、これらの結果として CL_{urine} が投与量によって変動したものと考えられる。

腎臓、脾臓、筋肉の取り込み速度は肝臓と比較すると非常に小さく、これらの組織による取り込みは dextran の体内動態には殆ど影響を及ぼさないことが明らかとなった。

4-d 生理学的薬動学モデルによる解析

Table V には、式 (7) ~ (9) に基づき、Fig. 14 の dextran の血漿中濃度および肝臓移行量から算出した $K_{m,p}$ 、 $V_{max,p}$ 、 $K_{m,l}$ 、 $V_{max,l}$ を Gal-BSA の値とともに示した。これらの値を用いて算出される各投与量での血漿中濃度および肝臓移行量の simulation curve を Fig. 14 に示す。得られた理論曲線は実験結果をよく反映していることから、本モデルは糖修飾 BSA の体内挙動だけでなく、投与量依存的な肝移行動態を示す dextran の体内動態解析にも適用可能であることが示された。dextran の $K_{m,l}$ は、Gal-BSA の $K_{m,l}$ と比較した場合には 100 倍以上も大きく、肝臓取り込み過程の affinity は低いことが推察された。

dextran と Gal-BSA とを同時投与した場合、相互に肝臓取り込みを競合的に阻害すると仮定すると、dextran の肝臓による取り込みクリアランス ($\text{CL}_{\text{liver},D}$) は次式により表される。

$$\text{CL}_{\text{liver},D} = \frac{V_{\text{max},l,D}}{K_{m,l,D} \left(1 + \frac{C_{l,GB}}{K_{m,l,GB}}\right) + C_{l,D}} \quad (16)$$

ここで、添字の D 、 GB はそれぞれ dextran および Gal-BSA のパラメータであることを表す。dextran の肝臓以外への消失は主に尿中排泄であることから、PP からの消失過程では阻害が起きな

Table V Pharmacokinetic parameters of ¹⁴C-labeled dextran and ¹¹¹In-labeled Gal-BSA

Compound	Liver			Plasma		
	$K_{m,l}$ ($\mu\text{g/ml}$)	$V_{max,l}$ ($\mu\text{g/hr}$)	$V_{max,l}/K_{m,l}$ (ml/hr)	$K_{m,p}$ ($\mu\text{g/ml}$)	$V_{max,p}$ ($\mu\text{g/hr}$)	$V_{max,p}/K_{m,p}$ (ml/hr)
Dextran	34.3 \pm 9.0	156 \pm 24	4.56	236 \pm 99	388 \pm 95	1.64
Gal-BSA	0.308 \pm 0.017	489 \pm 26	1,590	11.0 \pm 3.1	399 \pm 67	36.2

Each parameter was calculated based on the model (Fig. 13) and was obtained by fitting the differential equations (7)-(9) to experimental data of plasma concentration and liver accumulation time courses of ¹⁴C-labeled dextran at three doses. The parameters of ¹¹¹In-labeled Gal-BSA are also listed for comparison. $K_{m,l}$ and $V_{max,l}$, Michaelis constant and the maximum rate for liver uptake, respectively. $K_{m,p}$ and $V_{max,p}$, Michaelis constant and the maximum rate for extrahepatic elimination, respectively.

いと仮定すると、Gal-BSA と同時投与した場合の dextran の PP、EC、IC の各コンパートメントに関する物質収支式はそれぞれ以下ようになる。

$$\frac{dC_{p,D}}{dt} = (QC_{l,D} - QC_{p,D} - \frac{V_{max,p,D}}{K_{m,p,D} + C_{p,D}} C_{p,D}) / V_p \quad (17)$$

$$\frac{dC_{l,D}}{dt} = (QC_{p,D} - QC_{l,D} - \frac{V_{max,l,D}}{K_{m,l,D} (1 + \frac{C_{l,GB}}{K_{m,l,GB}}) + C_{l,D}} C_{l,D}) / V_l \quad (18)$$

$$\frac{dX_{l,D}}{dt} = \frac{V_{max,l,D}}{K_{m,l,D} (1 + \frac{C_{l,GB}}{K_{m,l,GB}}) + C_{l,D}} C_{l,D} \quad (19)$$

式 (17) ~ (19) およびこれらと対応する Gal-BSA に関する物質収支式に対し、モデルに基づく解析から算出されたパラメータを代入し、Gal-BSA と同時投与した場合の dextran の体内挙動パターンを推定した。Fig. 16 に Gal-BSA (30 mg/kg) と同時投与した場合の dextran (1 mg/kg) の血漿中濃度および肝臓移行量の経時変化に対する理論曲線を示す。推定した理論曲線は同時投与実験の結果をよく反映しており、Gal-BSA の同時投与による dextran の肝移行動態の変化が、肝臓取り込み過程の競合阻害を仮定することによって説明可能であることが示された。

I-5 考察

ターゲティング型 DDS の開発には、薬物あるいはキャリアー分子の体内動態を制御可能な化学修飾法の利用が不可欠である。糖鎖認識機構を介する選択的薬物ターゲティングを実現するには、

糖残基を有するキャリアーの利用が必須であり、天然に存在する糖タンパク質の利用のみならず種々の糖修飾法^{46,99-101)}が開発されている。中でも、正電荷の減少による体内動態特性の変化¹⁰²⁾および酵素へ応用する場合の活性の保持能¹⁰³⁾などを考慮し、本研究ではタンパク質の等電点を変化させない imidate 法⁴⁶⁾を採用した。本章では、この方法により Gal-BSA、Glc-BSA、Man-BSA をモデル糖修飾高分子として合成し、糖修飾高分子の体内動態特性の定量的解析法について基礎的検討を行った。

タンパク質をはじめとする高分子の体内動態の検討には放射性同位元素を用いて標識した放射標識体の利用が有効であり、様々な核種に対し数多くの放射標識法が開発されている。高分子は細胞に取り込まれた後、分解、代謝、細胞外への排出など様々な過程を経ることが考えられ、標識法によっては放射標識が生体内で不安定であるとか高分子の分解によって生じる代謝産物が分布するなど^{104,105)}、高分子の分布過程の定量的評価には好ましくない場合がある。循環血中から組織への分布特性を定量的に評価するには、高分子が代謝された場合でも放射活性体が細胞中に滞留することが望ましい。本研究では、3 種類の方法により放射標識した Gal-BSA を用い、糖修飾高分子の組織分布を評価するのに適した放射標識法について検討した。肝臓中放射活性の経時変化を追跡した結果、cDTPA を介して ¹¹¹In 標識した場合には長時間肝臓中に放射活性が蓄積することが示され、この方法が糖修飾高分子の組織分布評価に十分利用できることが示された。cDTPA を用いて ¹¹¹In 標識したタンパク質では、細胞内で ¹¹¹In-DTPA-lysine が放射性代謝物として生成することが報告されており⁵⁰⁾、この水溶性の高い分解産物が細胞内外の膜を透過しないために放射活性が長時間組織中に留まる原因であると推察される。これに対し、Bz-EDTA を 2 官能性キレート試薬として用い ¹¹¹In 標識した場合には、生成する分解産物の膜透過性が cDTPA の場合よりも高いために比較的速やかに肝臓から小腸内へと放射性代謝物が排泄されたものと思われる。一方、¹²⁵I 標識では肝臓から速やかに放射活性は消失したが、こうした radioiodine を用いた標識法に関しても取り込んだ細胞中に放射活性体を滞留させることを目的とした residualizing label の開発が行われている¹⁰⁶⁻¹⁰⁸⁾。しかしながら、現在検討されている residualizing label は cellobiose などの糖を利用したものが多く、こうした付加物が高分子本来の体内動態に影響を及ぼさないかどうかを検討する必要がある。

糖修飾 BSA の静脈内投与後の体内動態を検討した結果、galactose 修飾および mannose 修飾はそれぞれ肝臓の実質細胞、非実質細胞への選択的ターゲティングに利用可能な方法であることが確認された。また、その薬動学的特性を組織取り込みクリアランスを用いて評価したところ、投与量が低い場合には血漿流速に匹敵するぐらいの速度で肝臓に取り込まれること、一方で高投与量時には取り込みに飽和が生じ取り込み速度が低下することが明らかとなった。

この糖修飾 BSA の投与量依存的な体内動態を解析するため、Michaelis-Menten 型の肝臓取り込み過程を組み込んだ生理学的薬動学モデルを構築した。モデルに基づき解析することにより糖修飾高分子の投与量依存的な肝臓移行動態を $K_{m,l}$ と $V_{max,l}$ の二つの薬動学パラメータで評価することが可能となった。この解析により得られた Gal-BSA の $K_{m,l}$ 値は 4.5 nM であり、in vitro 遊離肝細

胞を用いて算出された asialoorosomucoid の 37 °C での取り込みの K_m (2.6 ~ 7.7 nM)¹⁰⁹⁾ とほぼ等く、Gal-BSA が種々のアシアロ糖タンパク質の中でも最も速やかに血漿から消失する asialoorosomucoid に匹敵するくらい効率の良い肝細胞選択的キャリアーになりうることを示された。また、肝固有クリアランスは非常に大きく (1,600 ml/hr)、その肝臓取り込みは肝血流律速であることが明らかとなった。Gal-BSA、Glc-BSA と比較して Man-BSA の K_{m1} は 30 倍程度大きく算出されたが、糖残基数のほぼ等しい誘導体の肝灌流実験での動態を解析した結果 Gal-BSA と Man-BSA の結合定数はほぼ等しい¹¹⁰⁾ことから、Man-BSA も修飾率を高くすることによりさらに効率よく肝臓の非実質細胞にターゲティングすることが可能であると考えられる。一方、肝臓以外への非線形な消失に関しては Man-BSA の脾臓取り込み以外はその実体は明らかではないものの、全身での非特異的な組織結合、血管壁への吸着などが原因ではないかと思われる。

構築した生理学的薬動学モデルは、糖修飾 BSA に限らず dextran の投与量依存的な体内動態解析にも適用可能であることが示された。また、Gal-BSA と同時投与した時の dextran の血漿中濃度と肝臓移行量の経時変化は、肝臓取り込み過程での競合阻害を仮定することにより推定可能であることも示された。dextran の肝臓取り込み機構についてはいまだ不明な点が多いものの、Gal-BSA との同時投与の結果は dextran の肝臓取り込みにアシアロ糖タンパク質レセプターが関与していることを示唆するものである。

以上、糖修飾高分子の基本的な体内動態特性について糖修飾 BSA を用いて検討した結果、galactose 修飾高分子、mannose 修飾高分子はそれぞれ効率のよい肝実質細胞、肝非実質細胞への薬物キャリアーになりうることを示された。また、その体内動態の薬動学的解析により、糖修飾 BSA の臓器取り込みの特異性ならびに投与量依存性を肝血流速度などの生理学的パラメータと直接比較可能な組織取り込みクリアランスとして定量的に評価することが可能となった。さらには、生理学的薬動学モデルに基づき糖修飾 BSA の体内動態を解析することにより、糖修飾高分子の肝移行動態におけるレセプターへの結合性、血流速度などの影響を明らかにした。本章における結果は、高分子に対して糖修飾を施すことにより細胞選択的なターゲティングが可能であることを示すものであり、こうした情報は糖修飾を利用したターゲティングシステムの開発を進める上で有用な基礎的知見を与えると考える。

第Ⅱ章 肝臓指向性キャリアーの開発とそれを利用した薬物ターゲティング

低分子薬物の標的細胞へのターゲティングは、適当な物理化学的および生物学的特性を付与した高分子をキャリアーとして用いることにより達成可能である^{8,9,111}。低分子薬物－高分子結合体の設計を行うには橋田ら¹¹²が整理しているように、①高分子自身の分解・非分解性、②分子量、電荷、溶解度など分子全体の物理化学的性質をコントロールする構造、③薬物と高分子の結合様式、④特定部位に親和性を持つ構造などの各項目をそれぞれ選択する必要がある。糖修飾を利用した肝臓への薬物ターゲティングにおいても、単に糖修飾を施すだけでなくそれ以外の特性をも最適化することが必要である。従って、前章で用いた糖修飾 BSA に薬物を結合することにより効率の良い肝臓へのターゲティングが達成できると考えられるものの³⁻⁷、薬物キャリアーとしてアシアロ糖タンパク質や糖修飾タンパク質などを用いる場合には、薬物との結合の困難さ、結合体の免疫原性、キャリアータンパク質自身が有する不適当な体内動態特性など種々の問題点が挙げられる¹¹³。こうした理由から、これらに変わりうるキャリアー分子の開発が強く望まれる。単一の構成要素からなるポリマーは、抗原性が低いこと、また修飾可能な官能基を有する場合には多

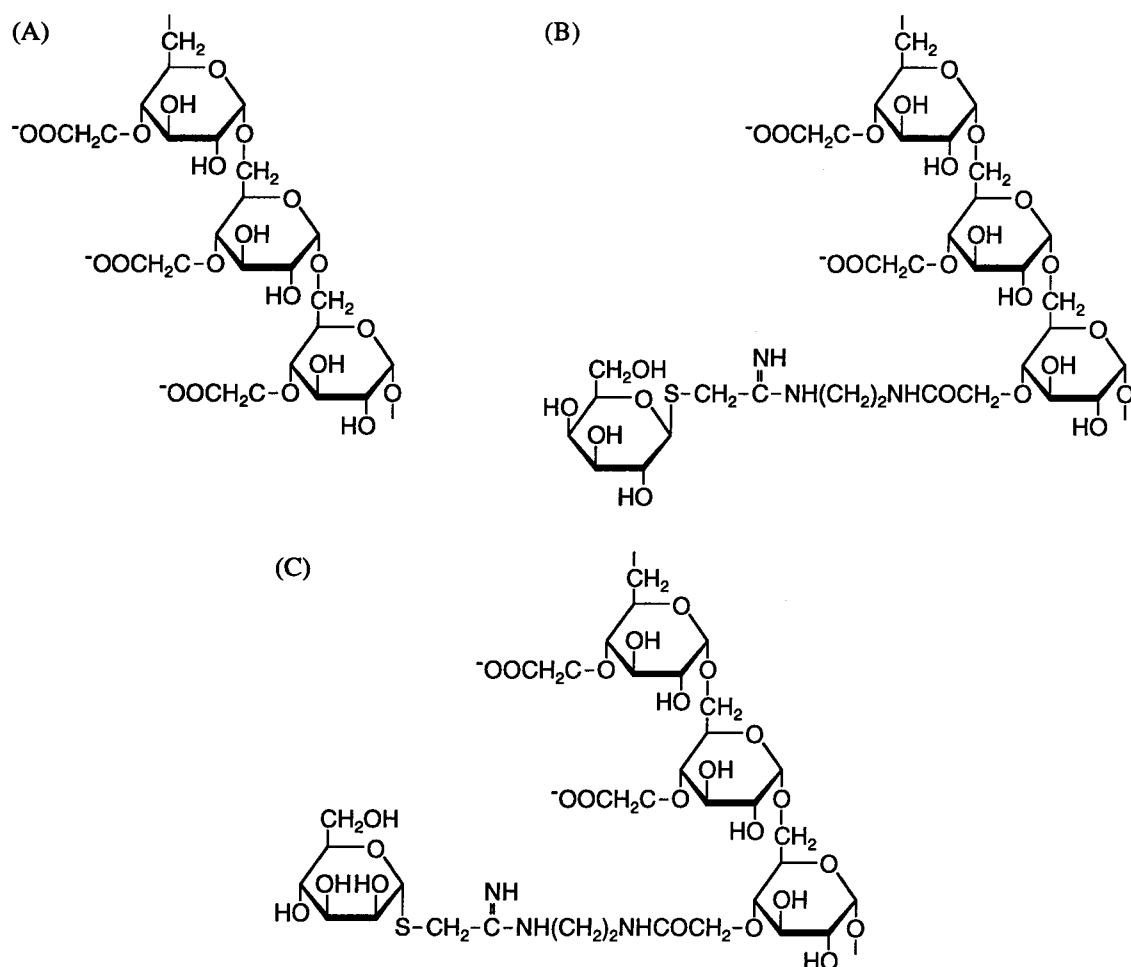


Fig. 17 Chemical structures of dextran derivatives. (A), carboxymethyl-dextran (CMD); (B), galactosylated CMD (Gal-CMD); (C), mannosylated CMD (Man-CMD).

数の薬物を結合可能なことなどから薬物キャリアーとしての利用が期待されており、その代表として多糖類やポリアミノ酸などが挙げられる。従って、これらを基本骨格とし適当な物理化学的性質の修飾と共に galactose あるいは mannose 修飾を施すことにより肝臓選択的薬物キャリアーが開発可能であると考えられる。

そこで本章においては、dextran¹¹⁴⁾ならびに poly-L-glutamic acid (PLGA)^{115,116)}をキャリアー骨格とする細胞選択的キャリアーを開発し、静脈内投与後の肝臓移行動態を中心に検討し、肝臓選択的薬物ターゲティングへの適用を試みた。

II-1 dextran を利用した肝臓指向性キャリアーの開発

前章において明らかにしたように dextran は肝臓の実質細胞へ比較的速やかに取り込まれることから薬物キャリアーとして幅広く利用するにはこの動態特性を消去することが必要であると考えられる。dextran の水酸基を carboxymethyl 化した carboxymethyl-dextran (CMD) は、細胞との相互作用が小さく、静脈内投与後長時間血漿中に安定に滞留することが知られている⁸⁹⁾。そこで本節では、先ず CMD を合成し、これに galactose あるいは mannose 修飾を施すことにより dextran を骨格とする肝臓指向性キャリアーの開発を試みた¹¹⁴⁾。

1-a 糖修飾 dextran 誘導体の合成およびその物理化学的性質

平均分子量約 70,000 の dextran を用い、塩基存在下 monochloroacetic acid と反応させることにより CMD を合成した。得られた CMD にスペーサーとして ethylenediamine をカルボジイミド法により結合した後、第 I 章と同様の方法により galactose 修飾 CMD (Gal-CMD) および mannose 修飾 CMD (Man-CMD) を合成した。イオン交換樹脂を用いた検討から、いずれの修飾体も負に帯電していることが確認された。Fig. 17 に CMD 誘導体の化学構造を示した。

動物実験には、第 I 章 4 節と同様の方法により ¹⁴C 標識を施した dextran を用い、非標識体と同様の方法により ¹⁴C 標識 dextran 誘導体を合成した。

1-b 静脈内投与後の体内挙動

Fig. 18 に CMD、Gal-CMD および Man-CMD を投与量 1 mg/kg でマウスに投与した後の血漿中濃度ならびに肝臓移行量を示す。また、各臓器中濃度の経時変化を Fig. 19 に示す。投与後 2 時間までの間、CMD は肝臓をはじめとする組織へは殆ど移行せず、その結果として非常に高い血中滞留性を示した。一方、糖修飾 CMD では肝臓移行量が大幅に増大し、血漿中からの消失は速やかであった。特に、Gal-CMD では投与後 10 分の時点で投与量の 75 % が肝臓に集積した。投与後 2 時間までにおいて肝臓以外の臓器中濃度は肝臓中濃度と比較してかなり低いことから、Gal-CMD が

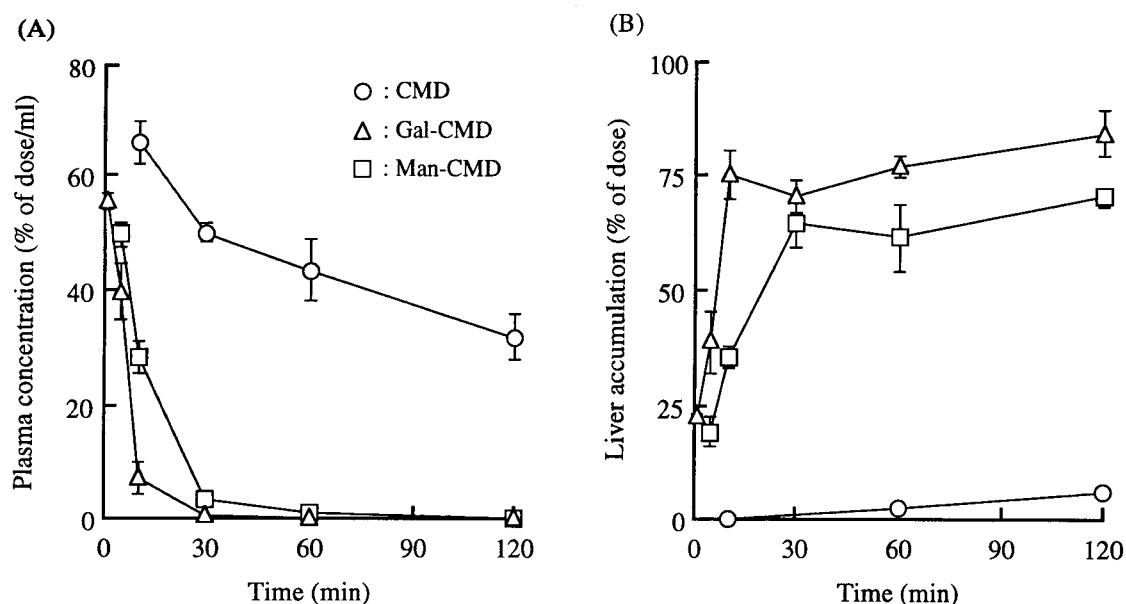


Fig. 18 Plasma concentration (A) and liver accumulation (B) of ^{14}C -labeled dextran derivatives after intravenous injection in mice at a dose of 1 mg/kg. Results are expressed as the mean \pm SD of four mice.

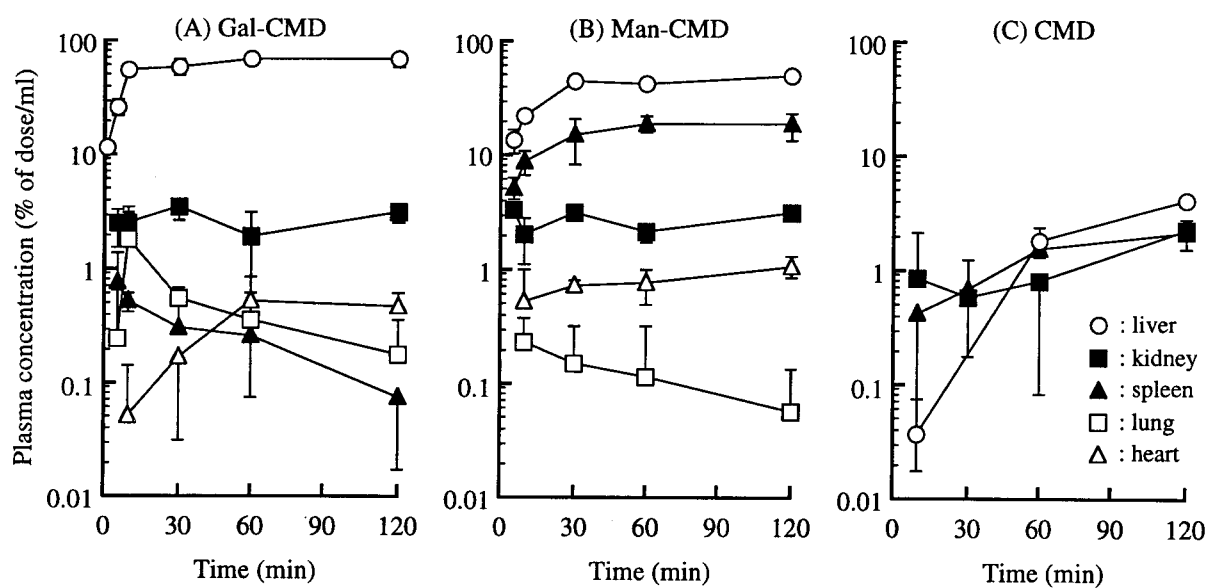


Fig. 19 Tissue concentration of ^{14}C -labeled dextran derivatives after intravenous injection in mice. Results are expressed as the mean \pm SD of four mice.

肝臓選択的なキャリアーとして機能することが示された。同様に、Man-CMD に関しても、Man-BSA 同様脾臓への移行が若干認められたものの、全体としては速やかに投与量の 70 % が肝臓に取り込まれた。

1-c 糖修飾 dextran 誘導体の肝臓取り込みにおける糖特異性の確認

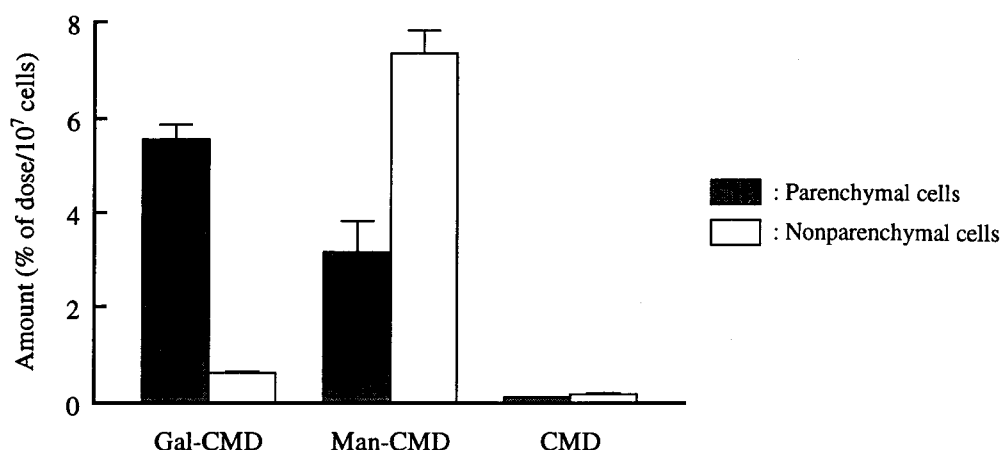


Fig. 20 Recoveries in the liver parenchymal and nonparenchymal cells of ¹⁴C-labeled dextran derivatives after intravenous injection in mice. Results are expressed as the mean \pm SD of three mice.

前項において、糖修飾 CMD が選択的に肝臓に移行することが明らかとなった。そこで、これら糖修飾 CMD の肝臓取り込みにおける糖特異性および細胞選択性について検討した。

各 CMD 誘導体を投与量 1 mg/kg で静脈内投与した後の各肝臓構成細胞への分布性に関して、第 I 章 2 節と同様の方法で検討した (Fig. 20)。その結果、Gal-CMD は実質細胞による取り込みが高いこと、一方 Man-CMD は非実質細胞による取り込みが高いことが明らかとなり、糖修飾 BSA の場合と同様の分布パターンを示した。さらに糖修飾 CMD の肝臓取り込み機構について、糖修飾

Table VI Plasma concentration and liver accumulation of ¹¹¹In-labeled glycosylated BSAs and ¹⁴C-labeled Man-CMD after intravenous injection in mice with other glycosylated macromolecule

Compound	Inhibitor	Plasma concentration (% of dose/ml)	Liver accumulation (% of dose)
Gal-BSA	none	0.88 \pm 0.27 ^{a)}	81.1 \pm 3.0
	Gal-CMD	35.7 \pm 4.3 *	33.0 \pm 3.1 *
	Man-CMD	0.53 \pm 0.09	84.0 \pm 1.9
Man-BSA	none	6.22 \pm 1.01	59.2 \pm 2.4
	Man-CMD	27.6 \pm 5.4 *	43.4 \pm 2.7 *
Man-CMD	none	3.45 \pm 0.54	64.5 \pm 4.9
	Man-BSA	51.1 \pm 3.2 *	19.2 \pm 5.0 *

¹¹¹In-labeled glycosylated BSA or ¹⁴C-labeled Man-CMD (1 mg/kg) was injected with other glycosylated macromolecule (10 mg/kg), and plasma concentration and liver accumulation were compared at 5 min for Gal-BSA, at 10 min for Man-BSA, or at 30 min for Man-CMD after injection.

^{a)} Results are expressed as the mean \pm SD of at least three mice.

* Statistically significant difference based on Student *t*-test ($P < 0.01$) as compared with each control.

BSA と同時投与することにより検討した。Table VI に、同時投与時の放射標識体の血漿中濃度と肝臓移行量を単独投与時の結果と共に示す。Gal-CMD を 10 mg/kg の投与量で投与したところ、 ^{111}In -Gal-BSA の血漿からの消失ならびに肝臓による取り込みは有意に抑制された。一方、Man-CMD は ^{111}In -Gal-BSA の動態に殆ど影響を及ぼさないこと、その一方で ^{111}In -Man-BSA の肝臓取り込みを抑制することが明らかとなった。また、 ^{14}C -Man-CMD の肝臓取り込みは Man-BSA の同時投与により抑制された。以上の結果から、dextran 誘導体の肝臓取り込みにおいても、修飾に用いた糖がレセプターにより特異的に認識され、それぞれ肝臓の実質細胞、非実質細胞へ選択的に取り込まれていることが強く示唆された。

1-d 体内動態の薬動学的解析

糖修飾 CMD の体内動態特性を定量的に評価するため、第 I 章 2 節と同様の方法で薬動学パラメータを算出し Table VII にまとめた。長時間血漿中を滞留する動態特性を反映し、CMD の CL_{total} は非常に小さいことが示された。一方、糖修飾 CMD の CL_{liver} は CMD と比較して 30 倍以上であり、いずれの場合にも CL_{total} の大部分を占めることが明らかとなった。

また Man-BSA と同様、Man-CMD の脾臓による取り込み速度は肝臓に次いで高く、Man-CMD に関しても脾臓による取り込み機構の存在が示唆された。それ以外の組織による取り込み速度はいずれの CMD 誘導体においても低いことが示され、糖修飾 CMD が肝臓選択的キャリアーになることが示された。

II-2 ara-C の肝細胞へのターゲティング

前節において、糖修飾 CMD が非常に効率のよい肝臓選択的キャリアーとして機能する可能性が示された。中でも、Gal-CMD は速やかかつ選択的に実質細胞に取り込まれることから、これをキャリアーとした肝細胞への薬物ターゲティングが達成できると考えられる。そこで本節では、薬物として抗癌剤シタラビン (ara-C) を選択し、Gal-CMD をキャリアーとする肝細胞選択的高分

Table VII AUC and clearances of ^{14}C -labeled dextran derivatives after intravenous injection in mice at a dose of 1 mg/kg

Compound	AUC (% of dose ·hr/ml)	Clearance (ml/hr)			Tissue uptake rate index (ml/hr/g)			
		CL_{total}	CL_{liver}	CL_{urine}	Liver	Spleen	Kidney	Muscle
CMD	195	0.512	0.147	0.185	0.139	0.059	0.027	0.004
Gal-CMD	5.6	17.8	15.1	1.31	12.2	0.013	0.547	0.057
Man-CMD	14.4	6.93	4.71	0.504	3.27	1.30	0.197	0.014

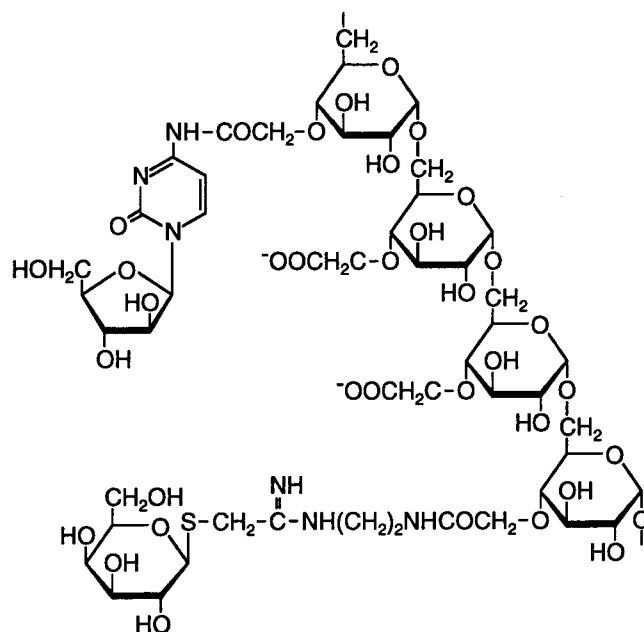


Fig. 21 Chemical structure of ara-C conjugate with Gal-CMD (ara-C-Gal-CMD).

子化プロドラッグの開発を試みた¹¹⁴⁾。

2-a ara-C-Gal-CMD 結合体の合成およびその物理化学的性質

ara-C は、酸無水物法により CMD のカルボキシル基に結合した¹¹⁷⁾。即ち、dimethylformamide に懸濁した CMD に対して isobutylchloroformate および triethylamine 共存下 ara-C を添加することにより ara-C-CMD を合成した。得られた ara-C-CMD に対し、前節と同様の方法により galactose 修飾を施すことにより ara-C-Gal-CMD を合成した。Fig. 21 に、合成により得られた ara-C-Gal-CMD の構造を示す。

Table VIII Physicochemical characteristics of ara-C conjugates with dextran derivatives

Compound	Number of ^{a)} galactose residues (mol/mol)	Number of ^{b)} ara-C (mol/mol)	Adsorption at pH 7.2 (%)	
			CM- Sephadex	DEAE- Sephadex
CMD	—	—	0	98.4
ara-C-CMD	—	15.8	0	72.9
ara-C-Gal-CMD	137	12.8	0	74.1

^{a)} The number of galactose residues was determined by trinitrobenzene sulfonic acid method.

^{b)} The number of ara-C was determined by the UV absorption at λ_{\max} 300 nm.

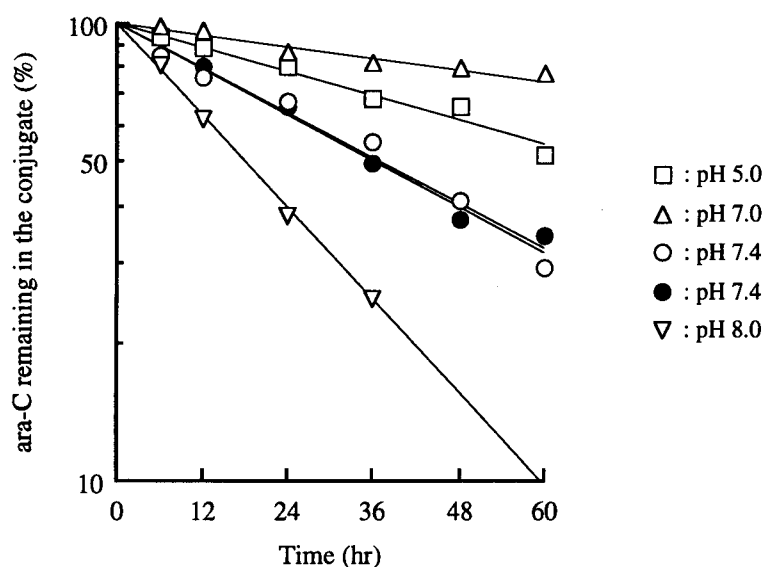


Fig. 22 *In vitro* release of ara-C from ara-C-CMD (open symbol) and ara-C-Gal-CMD (closed symbol) conjugates. Conjugates were incubated in 0.1 M phosphate buffer of pH 5.0, 7.0, 7.4, or 8.0. The amount of ara-C released was photometrically determined at λ_{\max} 272 nm.

Table VIII に ara-C 結合体の物理化学的性質を CMD の性質と共にまとめた。ara-C 分子の結合数は、一分子あたり ara-C-CMD、ara-C-Gal-CMD でそれぞれ約 16、13 個であった。また、amino 基の減少から求めた ara-C-Gal-CMD の一分子あたりの galactose 残基数は約 140 個であった。また、いずれの ara-C 結合体も電気的には負電荷を保持していることが確認された。動物実験等には、 ^3H -ara-C を用いて同様の方法により合成した ara-C 結合体を用いた。

Fig. 22 に ara-C の高分子化プロドラッグからの 37 °C での放出性を検討した結果を示す。ara-C-CMD からの ara-C の放出速度は用いた緩衝液の pH に依存し、pH 7.0 のリン酸緩衝液中で最も遅く、放出半減期は約 160 時間であることが示された。また、pH の上昇あるいは低下と共に放出は速やかとなり、生理的条件下 (pH 7.4) では半減期約 36 時間で放出されることが示された。同様に求めた pH 7.4 における ara-C-Gal-CMD からの放出半減期は約 37 時間であり、galactose 残基の有無は ara-C の放出には影響しないことが示された。さらに、マウスから採取した血漿中での ^3H -ara-C-CMD からの ^3H -ara-C の放出半減期は約 22 時間であり、結合体からの ara-C 放出は血漿成分によって若干の影響は受けるものの、静脈内投与後結合体として安定に循環血漿中に存在することが示唆された。

2-b 静脈内投与時の体内挙動

Fig. 23 に ara-C ならびにその高分子化プロドラッグを投与したときの血漿中濃度と肝臓移行量を示す。0.1 nmol/kg の投与量で静脈内投与したところ ara-C は非常に速やかに血漿中から消失し、投与した放射活性のうち 80 % 以上が投与後 2 時間以内に尿中に回収された。ara-C-CMD を 1

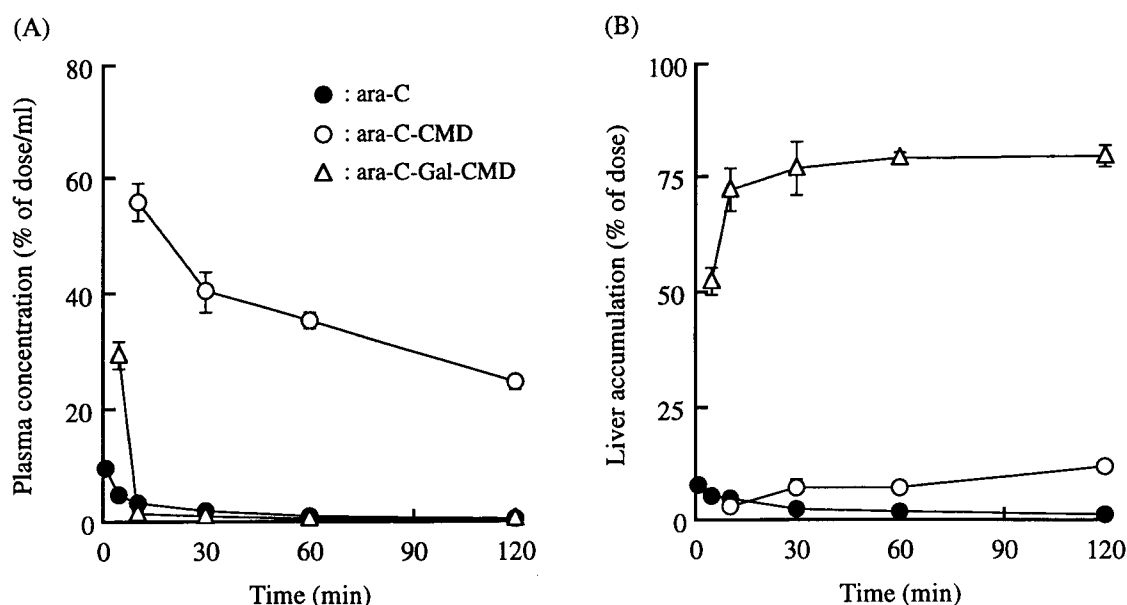


Fig. 23 Plasma concentration (A) and liver accumulation (B) of ³H-labeled ara-C and its conjugates with dextran derivatives after intravenous injection in mice. Results are expressed as the mean \pm SD of four mice.

mg/kg (ara-C 換算で約 0.2 nmol/kg) で投与した場合には、キャリアーである CMD の体内動態特性を反映し長時間血漿中に滞留し、肝臓への移行量は投与後 2 時間後でもわずかであった。一方、ara-C-Gal-CMD を 1 mg/kg (ara-C 換算で約 0.18 nmol/kg) で投与した場合には、投与した ara-C のうち約 80 % が速やかに肝臓へ送達されることが示された。また、この時の各肝臓構成細胞への分布性に関して、第 I 章 2 節と同様の方法で検討した結果、ara-C-Gal-CMD の取り込み量は実質細胞で 10^7 個細胞あたり投与量の 6.0 ± 0.2 %、非実質細胞で 0.5 ± 0.2 % であり、Gal-CMD 同様肝細胞に選択的に取り込まれていることが明らかとなった。

2-c 体内動態の薬動学的解析

これまでと同様の方法により ara-C 結合体の薬動学パラメータを算出し Table IX に整理した。ara-C は速やかに尿排泄されることを反映し非常に大きい CL_{urine} を持ち、肝臓をはじめとする各組

Table IX AUC and clearances of ³H-labeled ara-C and its conjugates with dextran derivatives after intravenous injection in mice

Compound	AUC (% of dose ·hr/ml)	Clearance (ml/hr)			Tissue uptake rate index (ml/hr/g)			
		CL_{total}	CL_{liver}	CL_{urine}	Liver	Spleen	Kidney	Muscle
ara-C	3.1	28.9	0.357	23.9	0.240	0.503	0.398	0.161
ara-C-CMD	167	0.596	0.156	0.151	0.130	0.026	0.023	0.002
ara-C-Gal-CMD	6.6	15.3	13.8	1.310	9.17	0.084	0.313	0.101

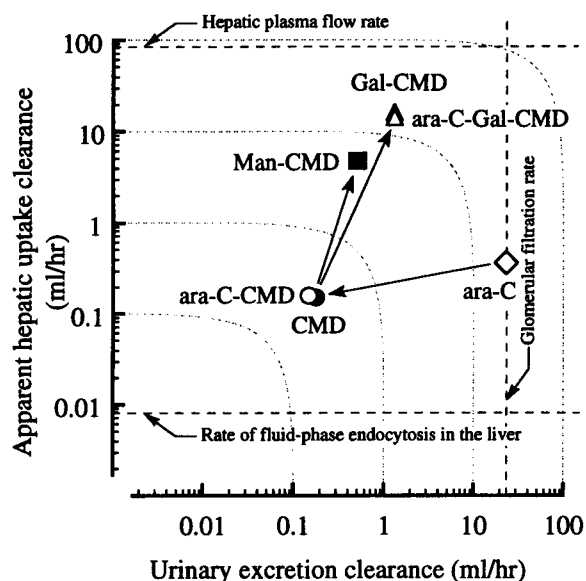


Fig. 24 Apparent hepatic uptake clearances and urinary excretion clearances of ^{14}C -labeled dextran derivatives and ^3H -labeled ara-C and its conjugates with dextran derivatives after intravenous injection in mice. The hepatic plasma flow rate (64), the rate of fluid-phase endocytosis in the liver (118), and the glomerular filtration rate (119) are shown for mice with a body weight of 25 g.

織への移行性は低いことが示された。これに対し、尿排泄されにくく組織移行性も低い CMD をキャリアーとすることにより、ara-C の CL_{urine} を著しく減少できることが示された。さらには、Gal-CMD に結合することにより ara-C の CL_{liver} を選択的に増大できることが明らかとなった。

以上の結果、ara-C の肝細胞へのターゲティングは、標的である肝臓取り込み速度の増大と肝臓以外への消失の大部分を占める尿中排泄速度の低下により達成できることが示された。CMD への結合ならびに galactose 残基の導入による ara-C の体内動態特性の変化を明らかにするため、Fig. 24 に各 dextran 誘導体ならびに ara-C 結合体の CL_{liver} と CL_{urine} を示した。ara-C-CMD、ara-C-Gal-CMD の全身動態はそれぞれ用いたキャリアー分子 (CMD、Gal-CMD) の動態特性を反映しており、ara-C を高分子化することで尿排泄を大幅に抑制可能であり、さらには galactose 修飾を施すことにより著しい肝指向性を付与できることが示された。

II-3 PLGA を骨格とする生分解性肝細胞選択的キャリアーの開発

前節において、dextran を基本骨格とする肝細胞選択的キャリアーの開発を行い、抗癌剤 ara-C のターゲティングに成功した。高分子化プロドラッグとして投与された薬物が標的細胞に移行後、作用を発現するにはキャリアーからの遊離、作用部位への移行が必要である。前節で開発した ara-C-Gal-CMD からの ara-C の放出半減期は数十時間と長いことが明らかとなり、こうした高分子化プロドラッグを用いた治療においてはより速く薬物が放出されることによって速やかな効果発現が期待できる。高分子化プロドラッグがエンドサイトーシスにより細胞に取り込まれた場合、

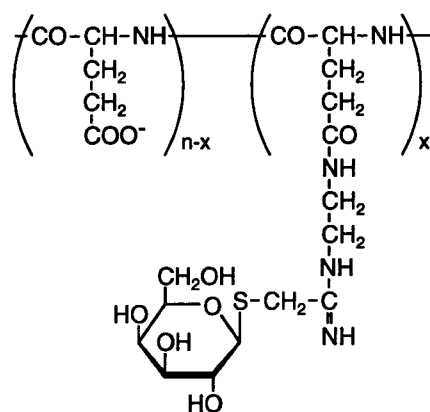


Fig. 25 Chemical structure of galactosylated poly-L-glutamic acid (Gal-PLGA).

細胞内の endosome や lysosome などのベシクル内に封入されることから^{120,121)}、キャリアー分子からの薬物の遊離を促進することを目的として、pH 感受性¹²²⁾あるいは cathepsin などの酵素により加水分解されやすい構造^{28,123)}を薬物-キャリアー間の結合に利用することが検討されている。一方、キャリアー自身が速やかに分解される場合には、薬物は結合様式に関わらず低分子化されると考えられ、前述のベシクル内から細胞質内へのリリースに有利であると考えられる¹²⁴⁾。また、キャリアー自身が分解されることは、体内への蓄積性の面から見てもより優れていると考えられる。

アミノ酸ホモポリマーの一種である poly-L-glutamic acid (PLGA) は、生体内分解性を有しており、また水溶性が高く、多くの化学修飾可能な官能基を有しており、また抗原性も低いなど生分解性キャリアーへの応用に適していると思われる。そこで、本節では PLGA を骨格とする肝細胞選択

Table X Physicochemical characteristics of PLGA and its galactosylated derivatives (Gal-PLGA)

Compound	Apparent ^{a)} molecular weight	Number of ^{b)} galactose residues (mol/mol)	Galactose ^{b)} content (%)
PLGA	25,200	—	—
Gal _{3,7} -PLGA	n.d. ^{c)}	3.71	2.58
Gal _{4,4} -PLGA	26,700	4.38	3.03
Gal _{6,6} -PLGA	26,400	6.61	4.51
Gal ₁₆ -PLGA	26,500	16.0	10.3
Gal ₁₈ -PLGA	25,600	18.2	11.5
Gal ₂₀ -PLGA	n.d.	19.5	12.2

^{a)} The apparent molecular weights of compounds were estimated by high-performance liquid chromatography gel filtration.

^{b)} The number of galactose residues and the galactose content of Gal-PLGAs were determined by anthrone-sulfuric acid method.

^{c)} Not determined.

的キャリアの開発を行い、体内動態特性ならびに分解性の評価を行い、その薬物キャリアとしての可能性を検討した^{115,116)}。

3-a Gal-PLGA の合成およびその物理化学的性質

まず、ethylenediamine に対しこれまでと同様の方法により IME-thiogalactoside を結合し、これを平均分子量約 25,000 の PLGA とカルボジイミド法により結合することで galactose 修飾 PLGA (Gal-PLGA) を合成した。Fig. 25 に Gal-PLGA の化学構造を示した。なお、合成時の反応比率を変化させることにより修飾率を変化させた合計 6 種類の Gal-PLGA を合成した。Table X に PLGA および各 Gal-PLGA の物理化学的性質を示した。galactose の結合により分子量はあまり変化しないことが示され、galactose 残基数が一分子あたり 3.7~20 個まで異なる Gal-PLGA が得られた。

以後の検討には、第 I 章でその有用性を明らかにした方法により ¹¹¹In 標識した放射標識体を用いた。

3-b PLGA 誘導体の静脈内投与後の体内挙動

先ずキャリア骨格である PLGA の動態特性を明らかにするため、¹¹¹In 標識 PLGA を 1 mg/kg の投与量でマウスに静脈内投与後の血漿中濃度、組織移行量ならびに尿中排泄量の経時変化を検討し、結果を Fig. 26 に示した。用いた PLGA の分子量が約 25,000 と比較的小さいことから、PLGA は速やかに血漿中から消失し主に腎臓に取り込まれ、一部は尿中へも排泄されることが明

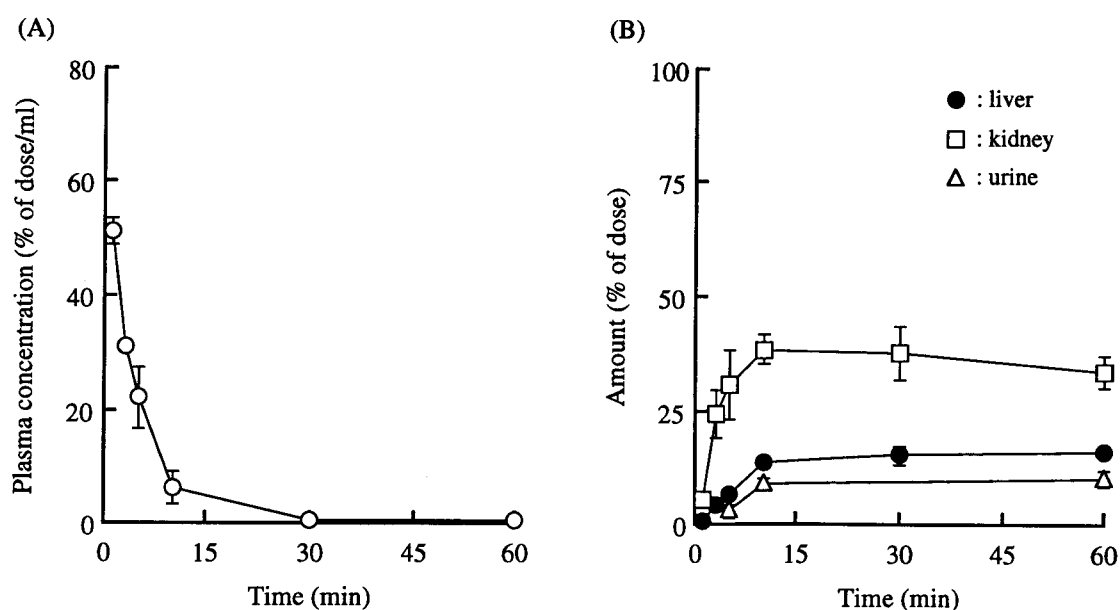


Fig. 26 Plasma concentration (A) and tissue accumulation and urinary excretion (B) of ¹¹¹In-labeled PLGA after intravenous injection in mice at a dose of 1 mg/kg. Results are expressed as the mean \pm SD of three mice.

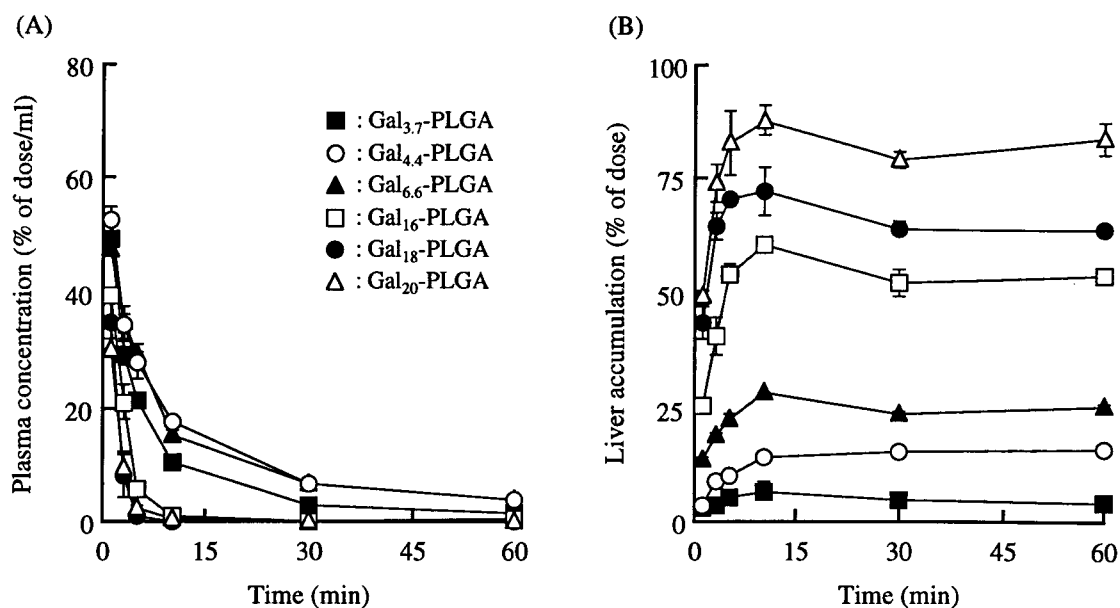


Fig. 27 Plasma concentration (A) and liver accumulation (B) of ^{111}In -labeled Gal-PLGAs after intravenous injection in mice at a dose of 1 mg/kg. Results are expressed as the mean \pm SD of three mice.

らかとなった。また、肝臓へは投与量の約 15 % が取り込まれた。一方、肺、心臓、脾臓、筋肉など他の組織には放射活性の蓄積は認められなかった。

Fig. 27 に各 Gal-PLGA を 1 mg/kg の投与量で静脈内投与したときの血漿中濃度ならびに肝臓移行量を示す。一分子あたりの galactose 残基数により Gal-PLGA の血漿からの消失ならびに肝臓取り込みは大きく影響されることが明らかとなった。galactose 残基数の増加に伴い肝臓取り込み速度ならびに移行量が増大し、Gal₂₀-PLGA、Gal₁₈-PLGA では投与量の 70 % 以上が肝臓へ移行することが示された。一方、最も修飾率の低い Gal_{3,7}-PLGA では投与量の 7 % 未満しか肝臓へは移行しなかった。

肝臓内での各構成細胞による取り込み量の違いを Gal₁₈-PLGA を用い、第 1 章 2 節と同様の方法で検討したところ、実質細胞で 10^7 個細胞あたり投与量の 3.5 %、非実質細胞で 0.03 % となり、Gal-PLGA が非常に肝細胞に選択的に取り込まれていることが示された。

3-c 体内動態の薬動学的解析

PLGA 誘導体の体内動態特性を定量的に評価するため、これまでと同様の方法で薬動学パラメータを算出し Table XI にまとめた。PLGA では、見かけの腎臓取り込みクリアランス ($\text{CL}_{\text{kidney}}$) と CL_{urine} は高く、その和はマウスの糸球体濾過速度¹¹⁹⁾に近い値であった。また、 CL_{liver} も 3.5 ml/hr と比較的高いことが明らかとなった。一方、Gal-PLGA の CL_{liver} は誘導体間で大きく異なり、Gal₂₀-PLGA では 55 ml/hr となり PLGA の約 16 倍の CL_{liver} を有するのに対し、Gal_{3,7}-PLGA と Gal_{4,4}-PLGA では PLGA よりも小さいことが明らかとなった。解析により得られた各 Gal-PLGA 誘

Table XI AUC and clearances of ^{111}In -labeled PLGA, Gal-PLGAs and vitamin K₅-Gal₁₈-PLGA after intravenous injection in mice at a dose of 1 mg/kg

Compound	AUC (% of dose ·hr/ml)	Clearance (ml/hr)			
		CL _{total}	CL _{liver}	CL _{kidney}	CL _{urine}
PLGA	4.68	21.3	3.45	9.66	1.44
Gal _{3,7} -PLGA	7.65	13.1	0.63	9.69	1.70
Gal _{4,4} -PLGA	10.2	9.79	1.55	5.44	2.26
Gal _{6,6} -PLGA	9.28	10.8	2.74	4.91	1.63
Gal ₁₆ -PLGA	2.40	41.6	22.5	5.36	2.93
Gal ₁₈ -PLGA	1.76	56.7	37.6	1.05	3.31
Gal ₂₀ -PLGA	1.53	65.5	55.1	0.71	3.14
vitamin K ₅ -Gal ₁₈ -PLGA	2.48	40.4	34.9	2.20	5.40

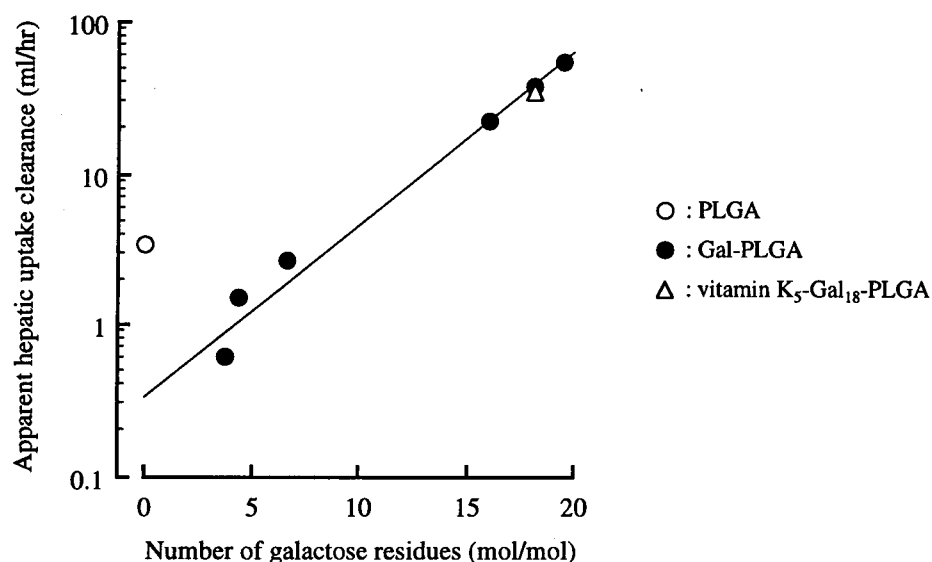


Fig. 28 Apparent hepatic uptake clearances of ^{111}In -labeled PLGA, Gal-PLGAs and vitamin K₅-Gal₁₈-PLGA after intravenous injection in mice at a dose of 1 mg/kg.

導体の CL_{liver} と一分子あたりの galactose 残基数との関係を Fig. 28 に整理した。galactose 残基数に対して CL_{liver} を片対数プロットしたところ、galactose 残基数の増加に伴い指数関数的に CL_{liver} が増加することが示された。

3-d Gal-PLGA の分解性評価

Gal-PLGA の分解性に関して ^{111}In 標識した Gal₁₈-PLGA を用い、Sephadex G-50 カラム (1 × 40 cm) によるゲル濾過クロマトグラフィーにより検討した。Gal₁₈-PLGA を 37 °C でマウス血漿中 1 時間

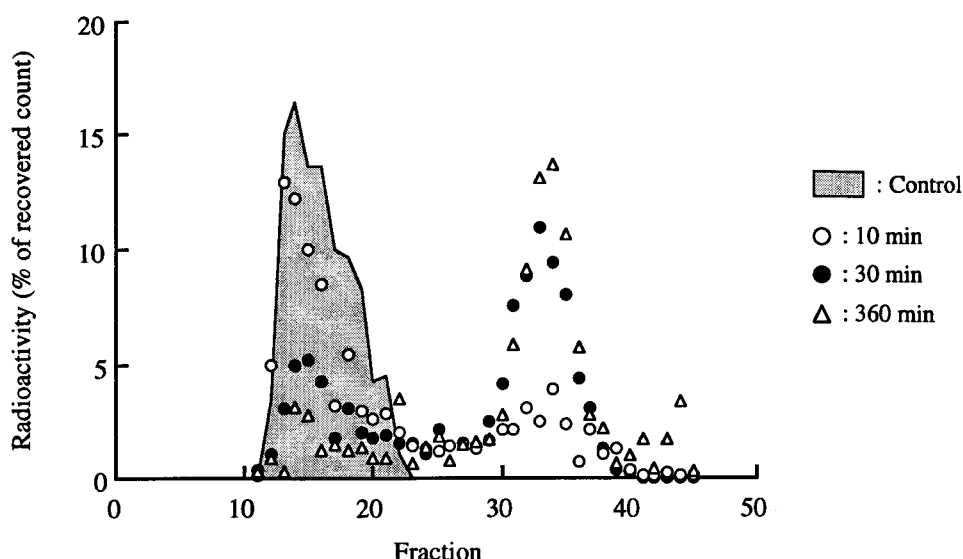


Fig. 29 Elution patterns on Sephadex G-25 column of radioactivity in the liver homogenates of mice injected with $^{111}\text{In-Gal}_{18}\text{-PLGA}$ at a dose of 1 mg/kg. Results are expressed as relative radioactivity in each fraction against the total counts detected.

インキュベーションした場合には、放射性低分子分解物は認められなかった。また、マウスから摘出した肝臓に $\text{Gal}_{18}\text{-PLGA}$ を添加後速やかにホモジネートした場合にも顕著な分解は認められなかった (Fig. 29、control)。そこで、肝臓移行後の Gal-PLGA の分解性について以下の手順で検討した。 $\text{Gal}_{18}\text{-PLGA}$ をマウスに投与後経時的に肝臓を摘出し、肝臓を精製水中でホモジネートした後遠心操作により得られた上清をゲル濾過し、放射活性の溶出パターンを指標に評価した。この操作により、肝臓中放射活性の 90 % 以上が上清中に回収された。Fig. 29 に投与後各時間に摘出した肝臓ホモジネート上清の Sephadex G-50 カラムにおけるクロマトグラムを示した。投与後 10 分の時点で肝臓を摘出した場合にも既に control 条件下では認められなかった低分子画分に放射性化合物の溶出が確認され、全体に占める低分子化合物の比率は時間の経過と共に増大した。投与後 30 分の時点では肝臓に回収された放射活性のうち 70 % 以上が低分子画分に回収され、 Gal-PLGA が肝臓移行後速やかに低分子化されていることが示された。

II-4 vitamin K_5 の肝細胞ターゲティングによる血液凝固能改善効果

前節の検討により、 Gal-PLGA は肝細胞選択性ならびに肝臓移行後の分解性を有することが明らかとなった。そこで本節では、効率よく肝臓へ移行することが示された $\text{Gal}_{18}\text{-PLGA}$ をキャリアーとする薬物ターゲティングについて検討した。検討に用いる薬物として血液凝固因子を活性化する vitamin K 誘導体の一種であり、誘導体の中で比較的水溶性の高い vitamin $\text{K}_5^{125)}$ を選択し、 $\text{Gal}_{18}\text{-PLGA}$ による肝細胞へのターゲティングについて体内動態ならびに病態マウスでの薬理効果について検討した¹¹⁶⁾。

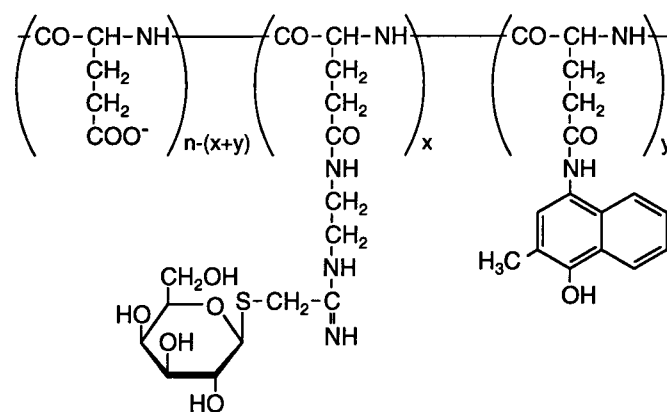


Fig. 30 Chemical structure of vitamin K₅ conjugate with Gal-PLGA.

4-a vitamin K₅-Gal-PLGA 結合体の合成およびその物理化学的性質

vitamin K₅ の Gal₁₈-PLGA への結合はカルボジイミド法により行った。得られた結合体一分子あたりの vitamin K₅ 結合数は約 12 個であった。Fig. 30 に vitamin K₅-Gal₁₈-PLGA の化学構造を示す。vitamin K₅-Gal₁₈-PLGA の体内動態の検討には、前節と同様の方法により Gal₁₈-PLGA 部分を ¹¹¹In 標識した放射標識体を用いた。

4-b 静脈内投与時の体内挙動および薬動学的解析

マウスに 1 mg/kg (vitamin K₅ 換算で約 0.07 mg/kg) の投与量で投与した時の血漿中濃度ならびに

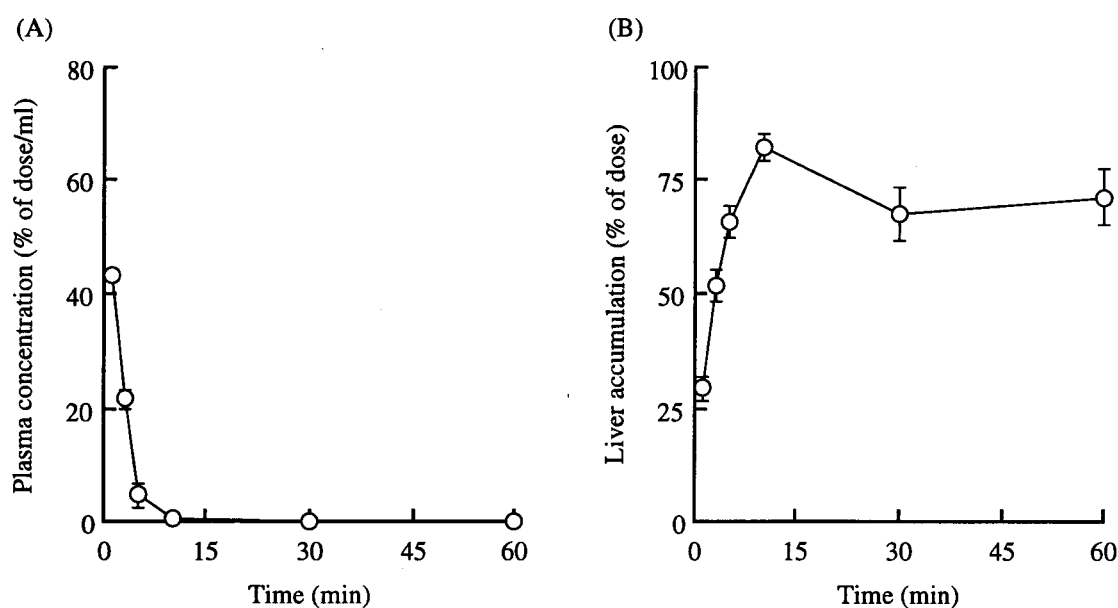


Fig. 31 Plasma concentration (A) and liver accumulation (B) of ¹¹¹In-labeled vitamin K₅-Gal₁₈-PLGA after intravenous injection in mice at a dose of 1 mg/kg. Results are expressed as the mean ± SD of three mice.

肝臓移行量を Fig. 31 に示す。vitamin K₅-Gal₁₈-PLGA は血漿中から速やかに消失し、投与した大部分が肝臓に取り込まれることが明らかとなった。また、これまでと同様の方法により薬動学パラメータを算出したところ、各パラメータはキャリアーである Gal₁₈-PLGA とほぼ等しいことが示された (Table XI、Fig. 28)。

4-c vitamin K₅-Gal-PLGA 投与による warfarin 処理マウスの血液凝固能改善効果

前項において、vitamin K₅ は Gal₁₈-PLGA に結合することにより肝細胞へ速やかにターゲティングされることが示唆された。そこで、本項では vitamin K₅ の肝細胞へのターゲティングの有効性を血液凝固能を指標として検討した。warfarin 溶液 (1.5 mg/l) を飲料水として 1 週間投与し、低プロトロンビン血症を誘発させたマウスに対し、薬物量として 10 mg/kg の vitamin K₅ あるいは vitamin K₅-Gal₁₈-PLGA を尾静脈内投与した。その後一定時間ごとに、マウスを屠殺すると共に大静脈より血液を採取し、血漿中の血液凝固活性をプロトロンビン時間法¹²⁶⁾により評価した。Fig. 32 に、各条件下でのプロトロンビン時間を示す。プロトロンビン時間は、warfarin 処理により未処理群 (11.3 ± 0.7 sec) と比較して有意に延長した。vitamin K₅ 投与群では、効果発現までに時間がかかり 4 時間後にはじめて有為なプロトロンビン時間の短縮が認められた。一方、vitamin K₅-Gal₁₈-PLGA 投与群では投与後 2 時間の時点ですでに血液凝固能の回復が認められ、その効果は 4 時間後まで持続した。

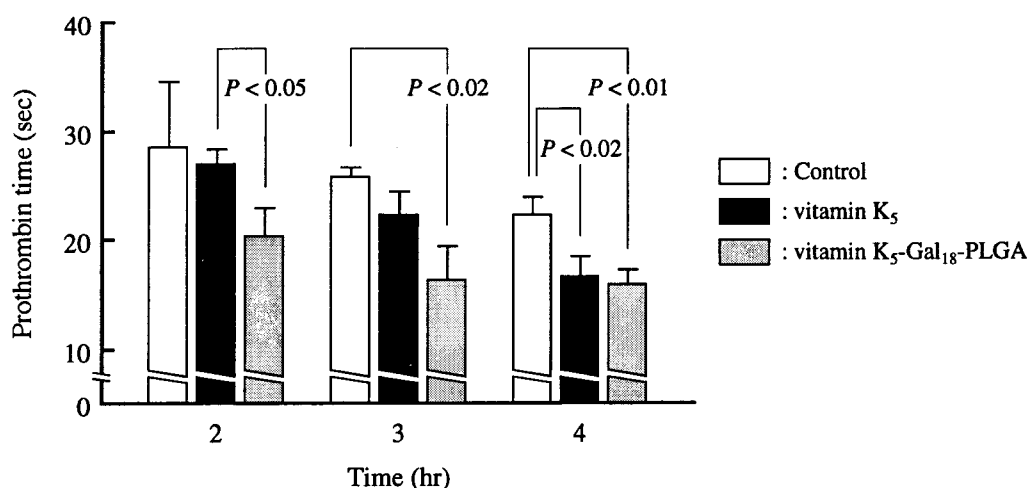


Fig. 32 Antihemorrhagic effects of vitamin K₅ and vitamin K₅-Gal₁₈-PLGA after intravenous injection on the hemorrhagic mice induced by warfarin treatment. Results are expressed as the mean ± SD of three or four mice. Differences were statistically evaluated by Student *t*-test.

II-5 考察

高分子をキャリアー骨格とした細胞選択的薬物ターゲティングシステムを合理的に開発するには、種々の高分子誘導体の体内動態に関する薬動学的情報に基づいた体内動態特性と分子構造との関連性を明らかにする必要がある。高分子の一般的な全身動態特性は分子量や電荷などの物理化学的性質に大きく影響を受けることが明らかとなっており^{52,53,89)}、また物理化学的性質の修飾によりタンパク質をはじめとする種々の高分子の体内動態を制御できることが示されている^{82-86,127,128)}。標的への薬物ターゲティングの効率は標的による取り込み速度と標的以外への消失速度とのバランスによって決まることから、糖修飾を利用した肝臓への薬物ターゲティングにおいても、標的となる肝臓での取り込み現象だけでなく全身動態をも考慮したキャリアー分子の開発を行う必要がある。そこで本章では、単一の構成単位からなる dextran と PLGA をキャリアー骨格として選択し、その分子全体の物理化学的性質の最適化と共に糖修飾を施すことにより肝臓指向型キャリアーシステムの開発を行い、薬物ターゲティングへの応用性を検討した。

dextran に carboxymethyl 基を付与した CMD は非常に小さな CL_{total} を有することから、静脈内投与後長時間血漿中に存在した。一般に細胞表面にはシアル酸を非還元末端に持つ糖タンパク質や糖脂質が多く存在するため、細胞表面は負に帯電していることが知られており¹²⁹⁾、正電荷を有する高分子は細胞への吸着性が高く¹³⁰⁾、これに対し CMD は弱負電荷を有することからいずれの組織へも殆ど取り込まれないものと考えられる。尿中への排泄に関しても、平均分子量約 70,000 の dextran を用いていることから size barrier と charge barrier としての 2 つの機能を持つ糸球体での濾過効率も低い^{96,131)}。従って、CMD は長時間血漿中に滞留する体内動態特性を有するものと考えられ、糖などの特定部位に親和性を持つ構造の導入により選択的ターゲティングが達成できると思われる。実際、CMD に糖修飾を施すことにより、効率の良い肝臓選択的なキャリアーが合成できた。薬動学的解析により得られた CL_{liver} は糖修飾 BSA と比較するとかなり小さいものの、肝臓以外への消失速度とのバランスからは十分大きく、Gal-CMD、Man-CMD は優れた肝臓指向型キャリアーであることが示された。

本研究では、薬物として抗悪性腫瘍薬 ara-C を選択し、Gal-CMD をキャリアーとする肝細胞へのターゲティングを試みた。ara-C は DNA polymerase 阻害活性を有し、急性骨髄性白血病などの治療に用いられるものの¹³²⁾、膜透過性が乏しく、また尿排泄により速やかに消失するため、何らかのデリバリーシステムを必要とする薬剤である¹³³⁾。この ara-C を Gal-CMD に結合することにより効率よく肝細胞へターゲティングすることが可能となり、また結合体から徐々に ara-C が放出されることも認められた。高分子結合体からの放出性は ara-C の amino 基部分を定量していることから、糖付加体や不活性代謝物 ara-U ではなく ara-C が放出されてきていると考えられる。しかし、この放出半減期は長いことから薬動学的解析において特に組織からの efflux を考慮する必要はなく、³H-ara-C の高分子化プロドラッグの体内動態特性は、キャリアーに用いた ¹⁴C-CMD 誘導体のそれと一致することが明らかとなった。

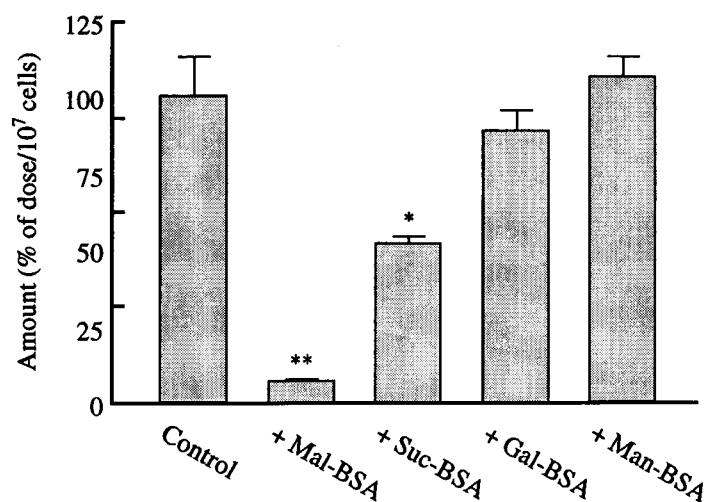


Fig. 33 Effect of co-injection of BSA derivatives on the liver accumulation of ¹¹¹In-labeled PLGA after intravenous injection in mice. ¹¹¹In-labeled PLGA was injected at a dose of 1 mg/kg with 20 mg/kg dose of maleylated BSA (Mal-BSA), succinylated BSA (Suc-BSA), Gal-BSA, or Man-BSA, and the amount in the liver was determined at 1 hr after the injection. Results are expressed as the mean \pm SD of three mice. Differences were statistically evaluated by Student's *t*-test against the control: *, *P* < 0.01; **, *P* < 0.001.

一方、未修飾 PLGA も静脈内投与後その一部が肝臓へ移行し、比較的高い CL_{liver} を示した。この肝臓取り込みは maleylated BSA (Mal-BSA) あるいは succinylated BSA (Suc-BSA) の同時投与により有意に低下した (Fig. 33)。Mal-BSA、Suc-BSA はともに肝臓の非実質細胞などに発現している scavenger receptor にポリアニオンとして取り込まれることが知られており^{127,134)}、PLGA はその負電荷により非実質細胞に取り込まれることが示唆された。従って、肝細胞へのターゲティングを行うにはこの動態特性を改善する必要がある。しかしながら、galactose 結合のスペーサーとして ethylenediamine を用いているため、galactose 修飾により PLGA の負電荷は若干減少すると推察され、実際 Gal_{3,7}-PLGA や Gal_{4,4}-PLGA では PLGA よりも CL_{liver} が小さくなった。これは、galactose の導入による肝細胞による取り込み速度の増大以上に、負電荷の減少により負電荷に基づく肝非実質細胞による取り込み低下の影響が大きかったためと考えられる。こうした物理化学的性質の改善効果もあり、Gal-PLGA は非常に選択的に肝細胞へ移行するものと思われる。用いた PLGA の平均分子量は約 25,000 と比較的小さいためいずれの Gal-PLGA 誘導体も比較的大きな糸球体濾過速度を有するものの、多くの galactose を結合することにより十分な CL_{liver} を付与でき、効率よく肝臓へターゲティングできる誘導体が開発可能であった。

この肝臓へ選択的に取り込まれる Gal-PLGA をキャリアーとすることにより、vitamin K₅ の肝細胞ターゲティングが達成でき、治療効果も改善された。vitamin K は肝細胞内でのプロトロンビンをはじめとする血液凝固因子の活性化に必須であり、vitamin K の欠乏あるいは warfarin 等の vitamin K 拮抗剤投与により血液凝固能が低下することが知られている¹²⁵⁾。vitamin K₅-Gal₁₈-PLGA 結合体投与後 vitamin K₅ の効果が発現されるためには、キャリアーからの遊離ならびに endosome、lysosome 等の細胞内ベシクルからの脱出、作用発現点への移行といった過程を経由する必要がある。

る。こうした vitamin K₃ の細胞内動態に関しては不明であるが、投与後速やかに効果発現が見られたことから vitamin K₃ は細胞内取り込み後速やかに低分子化され作用点まで移行しているものと考えられる。肝細胞内で速やかに分解される Gal-PLGA の性質が vitamin K₃ の速やかな効果発現を実現しているものと思われる。

以上、本章では dextran および PLGA を骨格とし糖修飾を利用することにより肝臓指向性キャリアを開発し、ara-C あるいは vitamin K₃ の肝細胞へのターゲティングに成功した。中でも PLGA を骨格とするキャリアシステムは、細胞に取り込まれた後速やかに分解されることから薬物放出に有利であると思われ、Gal₁₈-PLGA を用いた vitamin K₃ の肝細胞ターゲティングにより速やかな血液凝固能の回復が認められた。

第Ⅲ章 糖修飾による SOD の肝臓ターゲティングと虚血・再灌流障害に対する治療効果改善

第Ⅱ章では、糖修飾を利用した細胞選択的キャリアーシステムの開発に関して検討を行い、低分子薬物を効率よく標的細胞へターゲティングできることを明らかにした。最近では、低分子薬物の他に生理活性タンパク質の医薬品としての開発が進められているものの、これらの作用は時間的・空間的に限局されている場合が多く、その有効性を確保するには精密な体内動態制御が必要とされる。前章で触れたように、高分子の体内動態はその物理化学的性質の修飾により制御可能であることから、これまでも種々の化学修飾法による生理活性タンパク質の動態制御が試みられている^{134,135)}。しかしながら、こうした研究は高分子の結合による糸球体濾過の抑制あるいは免疫原性の低減を主目的としたものが多く、標的細胞への能動的ターゲティングを検討した例は殆ど見られない。

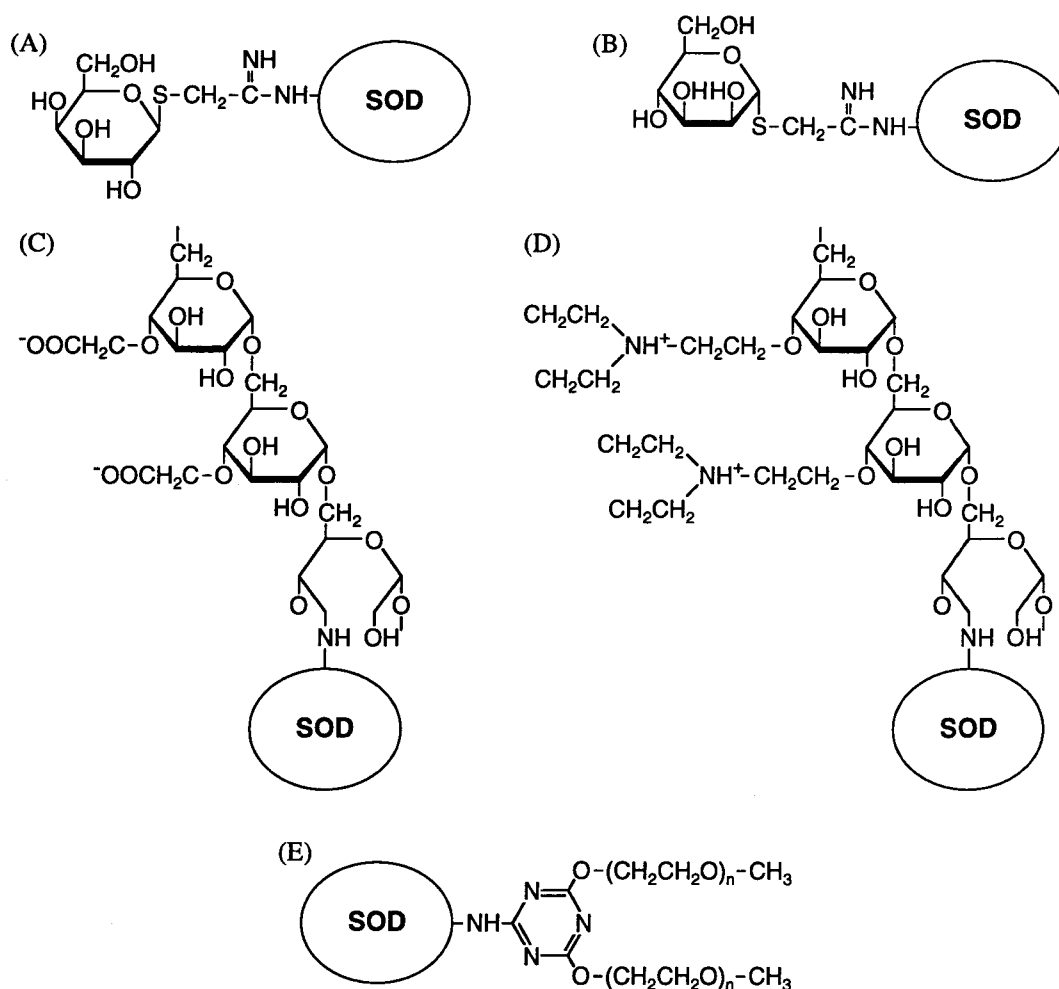


Fig. 34 Chemical structures of SOD derivatives. (A), galactosylated SOD (Gal-SOD); (B), mannosylated SOD (Man-SOD); (C), SOD-carboxymethyl-dextran conjugate (SOD-CMD); (D), SOD-diethylaminoethyl-dextran conjugate (SOD-DEAED); (E), SOD-polyethylene glycol (SOD-PEG₂).

そこで本章では、糖修飾の技術を生理活性タンパク質の体内動態制御へ応用することによるタンパク質医薬品の細胞選択的ターゲティングを試みた。生理活性タンパク質として、スーパーオキシドアニオンを不均化することにより活性酸素障害の抑制が期待されるヒト型遺伝子組換え superoxide dismutase (SOD) を選択し、糖修飾によるターゲティングの有効性について検討した^{136,137)}。

Ⅲ-1 各種化学修飾による SOD の体内動態制御

タンパク質の体内動態は種々の化学修飾により制御可能であることが報告されている^{82-86,127,128,138)}。従って、化学修飾をうまく利用すれば肝臓へターゲティングするだけでなく、SOD に様々な体内動態特性を付与できると思われる。こうした体内動態特性と治療効果との関連性を明らかにするため、糖修飾体以外にも種々の物理化学的性質を持つ高分子を結合させた誘導体も併せて合成し、先ず SOD 誘導体の体内動態特性について検討した。

1-a SOD 誘導体の合成およびその物理化学的性質

Fig. 34 に各 SOD 誘導体の化学構造を示した。第 I 章と同様の方法により galactose 修飾 SOD (Gal-SOD)、mannose 修飾 SOD (Man-SOD) を合成した。また、平均分子量約 10,000 の dextran を用い負電荷 (CMD) あるいは正電荷誘導体 (DEAED: diethylaminoethyl-dextran) を合成し、各誘導体を過ヨウ素酸酸化法¹³⁹⁾により SOD に結合することにより SOD-CMD、SOD-DEAED をそれぞれ合成した。さらに、平均分子量約 10,000 の活性化 PEG (2,4-bis(*O*-methoxypolyethylene-glycol)-6-chloro-s-

Table XII Physicochemical characteristics of SOD derivatives

Compound	Apparent ^{a)} molecular weight	Number of ^{b)} NH ₂ groups (mol/mol)	Remaining ^{c)} enzymatic activity	Electric ^{d)} charge (pH 7.4)
SOD	32,000	24.0	100	—
Gal-SOD	35,000	2.7	79.4	—
Man-SOD	34,000	3.8	65.5	—
SOD-CMD	150,000	15.0	50.0	—
SOD-DEAED	150,000	13.0	55.0	+
SOD-PEG ₂	270,000	14.5	47.0	—

^{a)} The apparent molecular weights of SOD derivatives were estimated by high-performance liquid chromatography gel filtration.

^{b)} The number of amino groups was determined by trinitrobenzene sulfonic acid method.

^{c)} SOD enzymatic activity was assayed by nitroblue tetrazolium reduction method.

^{d)} Net electric charge of SOD derivatives was confirmed by a batch method using DEAE-Sephadex A-50 anion exchanger and CM-Sephadex C-50 cation exchanger.

triazine) を反応させることにより SOD-PEG₂ を合成した¹⁴⁰⁾。Table XII に得られた SOD 誘導体の物理化学的性質をまとめた。単糖修飾により分子サイズの変化は殆ど認められないのに対し、高分子を結合した誘導体では顕著な分子サイズの増加が認められた。正電荷高分子である DEAED を結合した SOD-DEAED は正電荷を持つこと、またそれ以外の誘導体は負電荷を持つことが確認された。SOD 酵素活性はいずれの化学修飾によっても減少し、各修飾体は未修飾 SOD の 47 ~ 79 % の活性を保持することが示された。中でも、Gal-SOD、Man-SOD は残存活性が高く、一分子あたり約 20 残基の糖が結合しているにもかかわらずいずれも 65 % 以上の酵素活性を保持しており、この糖修飾法が活性保持の面からも優れていることが示された。

1-b SOD 誘導体の静脈内投与時の体内挙動

Fig. 35 に各 SOD 誘導体を 0.1 mg/kg の投与量でマウスに尾静脈内投与後の血漿中濃度と肝臓移行量を示した。未修飾 SOD は投与後速やかに血漿中より消失し、肝臓中には殆ど取り込まれなかった。Gal-SOD、Man-SOD は SOD よりもさらに速やかに血漿中から消失し、糖修飾 BSA 同様いずれも投与量の 75 % 以上が肝臓に取り込まれた。一方、SOD-CMD、SOD-PEG₂ では高分子結合による分子量増大の影響により糸球体濾過が抑制され、長時間循環血漿中に滞留することが示された。一方、高分子化と同時に正電荷を付与した SOD-DEAED は、比較的ゆっくりと肝臓に移行することが示された。肝臓へ移行した 3 種類の誘導体についてその細胞選択性を第 I 章 2 節と同様の方法で検討し、Fig. 36 に細胞 10⁷ 個あたりの移行量で示した。Gal-SOD、Man-SOD は実質細胞、非実質細胞にそれぞれ優先的に移行していることが確認された。また、SOD-DEAED は両

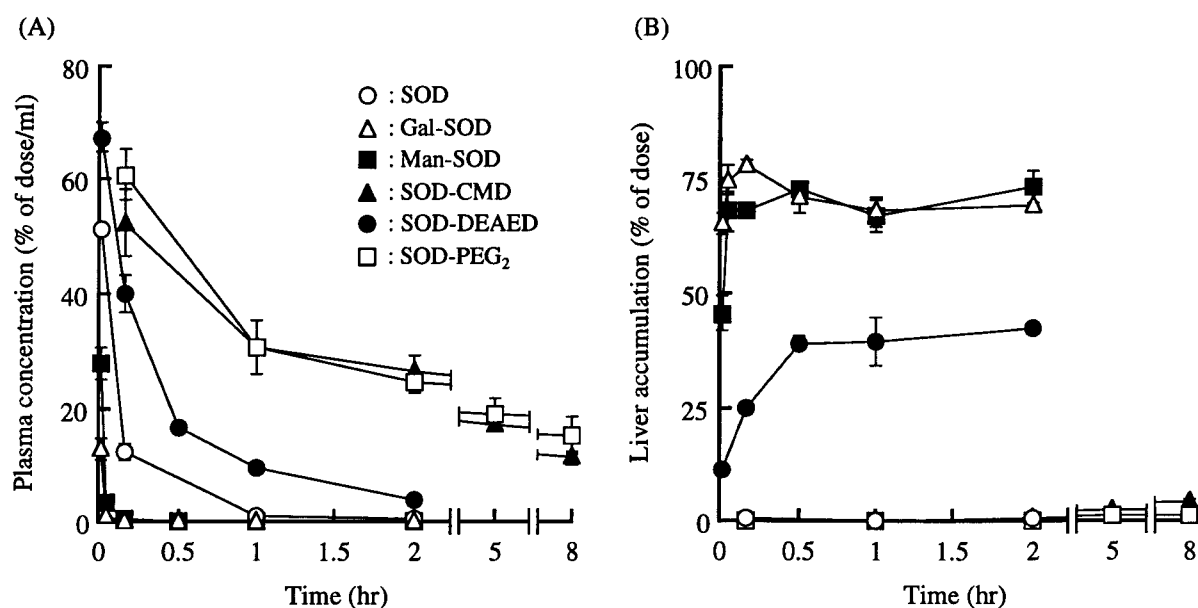


Fig. 35 Plasma concentration (A) and liver accumulation (B) of ¹¹¹In-labeled SOD derivatives after intravenous injection in mice at a dose of 0.1 mg/kg. Results are expressed as the mean ± SD of three mice.

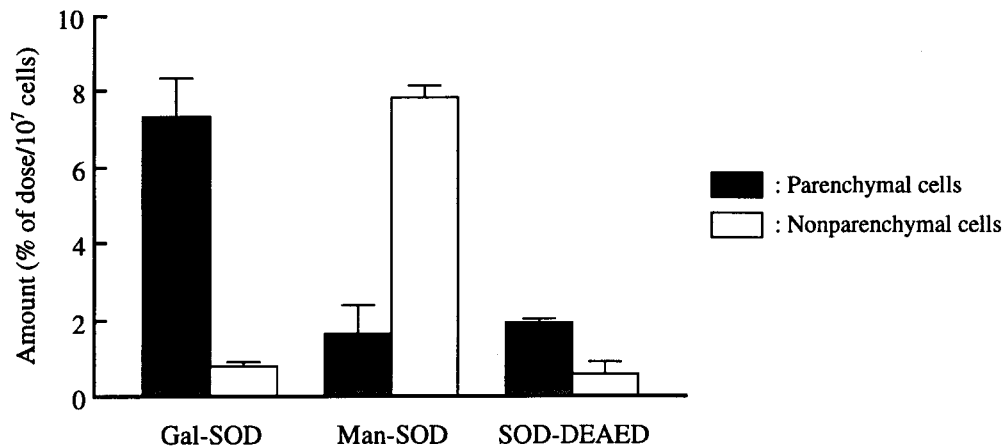


Fig. 36 Recoveries of ¹¹¹In-labeled SOD derivatives in the liver parenchymal and nonparenchymal cells after intravenous injection in mice. Results are expressed as the mean \pm SD of three mice.

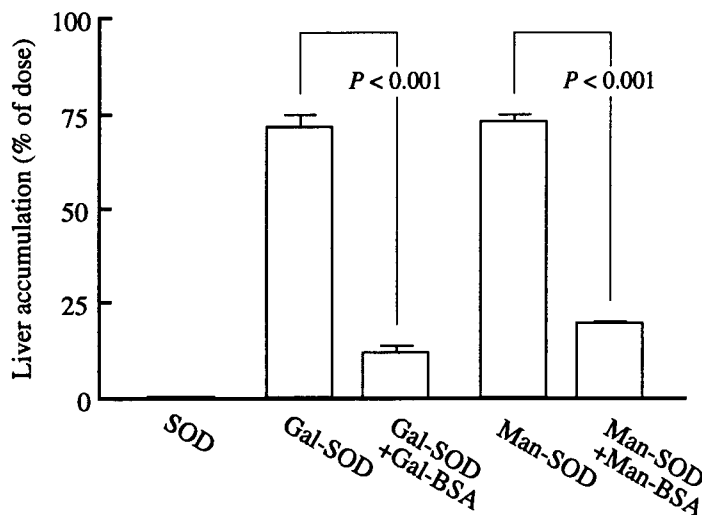


Fig. 37 Competition in hepatic uptake of ¹¹¹In-labeled glycosylated SODs by co-administration with glycosylated BSA after intravenous injection in mice. ¹¹¹In-labeled glycosylated SOD (0.1 mg/kg) was injected with glycosylated BSA (20 mg/kg) and liver accumulation was determined at 30 min after injection. Results are expressed as the mean \pm SD of three mice. Differences were statistically evaluated by Student *t*-test.

細胞分画に分布し、その分布比は肝臓中での血液と構成細胞との接触面積比¹⁴¹⁾とほぼ対応していることから、静電的相互作用により細胞表面に結合することが示唆された¹³⁰⁾。これら糖修飾 SOD の肝臓取り込み特性を検討するため、Gal-SOD、Man-SOD をそれぞれ大過剰の Gal-BSA、Man-BSA と同時投与したときの投与 30 分後の肝臓移行量を Fig. 37 に示す。Gal-SOD、Man-SOD の肝臓による取り込み量はそれぞれ同一の糖で修飾した糖修飾 BSA の同時投与により低下したことから、糖修飾 SOD は糖修飾 BSA と同一の機構で取り込まれていることが示唆された。

1-c 体内動態の薬動学的解析

SOD の体内動態特性に対する各修飾の効果を定量的に評価するため、これまでと同様の方法により薬動学パラメータを算出し、Table XIII にまとめた。SOD と糖修飾 SOD に関してはそれぞれ投与量が 100 倍、10 倍の時の体内動態についても検討し、その時のパラメータも併せて示した。

Table XIII AUC and clearances of ^{111}In -labeled SOD derivatives after intravenous injection in mice

Compound	Dose (mg/kg)	AUC (% of dose ·hr/ml)	Clearance (ml/hr)			Tissue uptake rate index (ml/hr/g)			
			CL _{total}	CL _{liver}	CL _{urine}	Liver	Spleen	Kidney	Muscle
SOD	0.1	9.49	10.5	0.0426	1.23	0.0262	0.0207	23.7	0.0310
	10	9.80	10.2	0.0521	3.75	0.0335	0.0149	21.5	0.0542
Gal-SOD	0.1	1.05	95.2	88.2	5.63	64.2	0.0540	0.596	0.158
	1	3.50	28.6	16.3	6.58	12.3	0.0330	0.354	0.0728
Man-SOD	0.1	1.37	72.9	53.4	3.40	37.2	9.79	1.28	0.0673
	1	5.06	19.8	11.9	5.21	8.39	4.01	0.861	0.0975
SOD-CMD	0.1	315	0.317	0.0218	0.0680	0.0210	0.0174	0.344	0.0019
SOD-DEAED	0.1	34.8	2.87	1.44	0.561	1.44	0.216	0.202	0.0216
SOD-PEG2	0.1	633	0.158	0.0107	0.0124	0.0120	0.0032	0.0405	0.0124

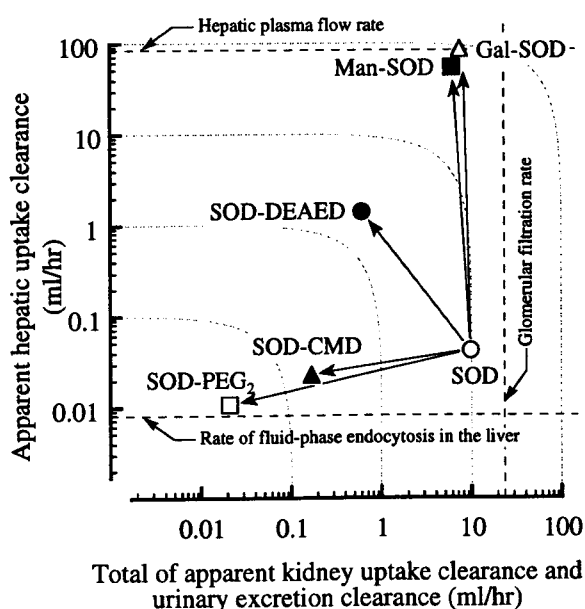


Fig. 38 Apparent hepatic uptake clearances and total of apparent kidney uptake and urinary excretion clearances of ^{111}In -labeled SOD derivatives after intravenous injection in mice. The hepatic plasma flow rate (64), the rate of fluid-phase endocytosis in the liver (118), and the glomerular filtration rate (119) are shown for mice with a body weight of 25 g.

未修飾 SOD は非常に大きい腎臓取り込み速度と比較的大きい CL_{urine} を持つことが示され、このタンパク質が循環血中に投与された後に速やかに糸球体濾過を受け、さらに尿細管で再吸収されることが強く示唆された。また投与量を 100 倍とした場合にも CL_{total} の変化はわずかであり、SOD が投与量によらず速やかに糸球体濾過されることが示された。これに対し、CMD や PEG₂ を結合した高分子結合型 SOD 誘導体では、分子サイズが増大したことによる糸球体濾過の抑制が認められた。また、SOD-DEAED では比較的小さい CL_{total} であるものの、その約 50 % を CL_{liver} が占めることが明らかとなった。一方、Gal-SOD、Man-SOD では投与量が 0.1 mg/kg の場合にはいずれもマウスの肝血漿流速に匹敵する大きさの CL_{liver} を有することが示された。

各化学修飾による SOD の体内動態制御について、標的である肝臓への移行と腎臓での糸球体濾過による消失を Fig. 38 にまとめた。横軸には糸球体濾過速度を表す指標として CL_{urine} と CL_{kidney} の合計を用いた。各種化学修飾により SOD の体内動態は劇的に変化することが示され、糖修飾を施すことにより約 1,000 倍の速度で肝臓へ送達できること、また PEG 化により糸球体濾過速度を数百分の一にまで低下できることが明らかとなった。

Ⅲ-2 肝臓の虚血・再灌流障害に対する SOD 誘導体の抑制効果

前節の検討により、糖修飾を施すことにより SOD を肝臓へ選択的にターゲティング可能であることが示された。そこで、本節では肝臓障害モデルを作成し、ターゲティングによる SOD の治療効果改善に関して検討を行った¹³⁷⁾。

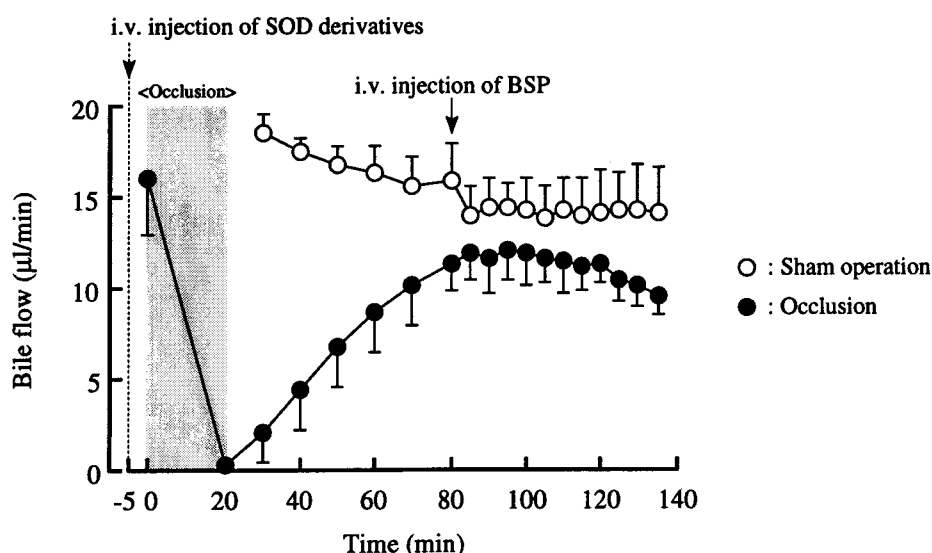


Fig. 39 Experimental procedure of the rat liver ischemia/reperfusion and bile flow rates during the experiment. Hepatic ischemia was elicited by occluding the portal vein and the hepatic artery for 20 min. After 60 min of reperfusion, sulfobromophthalein sodium hydrate (BSP) was bolusly injected into the right femoral vein, and the BSP level in bile was determined for 60 min. SOD derivatives were bolusly injected into the right femoral vein at a dose of 10,000 units/kg, at 5 min prior the occlusion. Bile flow rates are expressed as the mean \pm SD of three rats.

2-a 肝虚血・再灌流障害モデルの作成

肝臓をはじめとする各種臓器において、血流が遮断され虚血状態となった後に血流が再開された場合には、生体に本来備わっている消去能を上回る活性酸素が不可避免的に発生し、これにより近傍の細胞群が障害されることが知られている¹⁴²⁾。そこで、活性酸素障害の抑制が期待される SOD 誘導体の治療効果を検討するため、Kawamoto らの方法¹⁴³⁾に従い肝虚血・再灌流障害モデルを作成した。Wistar 系雄性ラットに対し麻酔下肝動脈と門脈をクランプして血流を遮断し、20 分後にクランプを外し血流を再開した。SOD あるいは SOD 誘導体は虚血開始 5 分前に 10,000 unit/kg の投与量で大腿静脈内に瞬時投与した。

Fig. 39 に実験手順の概要を整理すると共に、実験中の胆汁の流速を示す。虚血操作を行った群 (occlusion 群) では、再灌流開始直後においては胆汁の分泌は極端に低下しているものの時間の経過と共に徐々に回復し、再灌流開始後 60 分経過した時点では開腹手術のみを行った群 (sham operation 群) のレベルにまで回復することが示された。

2-b 肝虚血・再灌流障害の評価法の確立

肝障害の評価には、数種のトランスポーターにより血漿中から胆汁中へ分泌される肝機能診断薬 sulfobromophthalein (BSP)¹⁴⁴⁾を用い、再灌流開始 60 分後の時点で大腿静脈より投与した BSP の胆汁中への排泄パターンを指標に肝虚血・再灌流障害を評価した。Fig. 40 に各条件下での BSP の胆汁排泄パターンを示す。得られた排泄曲線をモーメント法¹⁴⁵⁾により解析し、肝障害性の定量化を行った。Fa (回収率)、ta (平均排泄時間) はそれぞれ次式により算出される。

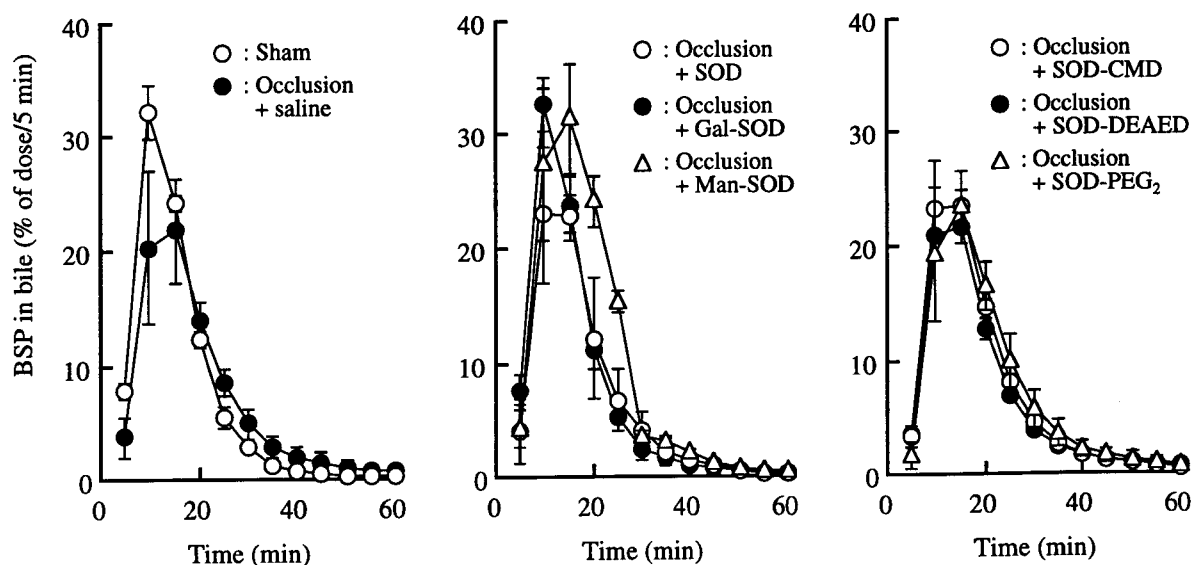


Fig. 40 Biliary excretion of BSP during rat liver ischemia/reperfusion experiment.
Results are expressed as the mean \pm SD of at least three rats.

$$Fa = \int_0^{\infty} \left(\frac{dX_b}{dt} \right) dt \quad (20)$$

$$\bar{t}a = \int_0^{\infty} t \left(\frac{dX_b}{dt} \right) \frac{dt}{Fa} \quad (21)$$

ここで、 t は時間であり、 dX_b/dt は BSP の胆汁排泄速度である。各モーメント値は山岡らの方法¹⁴⁶⁾に従い、実測点に関しては線形台形公式を適用し、それ以降については terminal phase に対して最小二乗法により理論式を求め、無限時間までの値を算出した。

2-c SOD 誘導体投与による障害抑制効果

Fig. 40 に示した BSP の胆汁排泄曲線をモーメント解析した結果を Table XIV に整理した。静脈内投与した BSP は sham operation 群では胆汁中への排泄率が 94 %、平均排泄時間が 15.2 分と投与した大部分が速やかに胆汁中へ排泄されることが示された。虚血・再灌流を行うことにより排泄率は 78 % にまで低下し、また平均排泄時間も 18.2 分と延長することが明らかとなり、虚血・再灌流操作により肝障害が発生していることが確認された。

各 SOD 誘導体投与による治療効果を明確にするため、Fig. 41 に各条件下での BSP の胆汁中排泄率と平均排泄時間を sham operation 群に対する百分率で整理した。BSP の排泄に関する両パラメータに対して未修飾 SOD の投与は殆ど効果が無いことが示された。一方、Gal-SOD、Man-SOD 投与群では排泄率、排泄時間ともに sham operation 群と匹敵する値にまで回復することが明らかと

Table XIV Moment parameters for biliary excretion of BSP after intravenous injection of SOD derivatives in rat liver ischemia/reperfusion experiment

Treatment	Fa (% of dose)	$P^a)$		$\bar{t}a$ (min)	P	
		vs. Sham	vs. Occlusion		vs. Sham	vs. Occlusion
Sham operation	93.9 ± 4.7	—	< 0.01	15.2 ± 0.5	—	< 0.01
Occlusion + saline	78.2 ± 3.2	< 0.01	—	18.2 ± 1.4	< 0.01	—
+ SOD	81.8 ± 4.0	< 0.01	n.s. ^{b)}	18.0 ± 2.0	< 0.05	n.s.
+ Gal-SOD	91.0 ± 7.5	n.s.	< 0.01	15.6 ± 1.3	n.s.	< 0.01
+ Man-SOD	94.6 ± 6.1	n.s.	< 0.01	15.5 ± 1.1	n.s.	< 0.02
+ SOD-CMD	86.3 ± 4.2	< 0.05	< 0.01	17.4 ± 1.2	< 0.01	n.s.
+ SOD-DEAED	81.7 ± 2.0	< 0.01	n.s.	20.9 ± 4.1	n.s.	n.s.
+ SOD-PEG ₂	89.3 ± 2.6	n.s.	< 0.01	19.4 ± 3.5	< 0.05	n.s.

^{a)} Differences were statistically evaluated by Student *t*-test.

^{b)} Not significant.

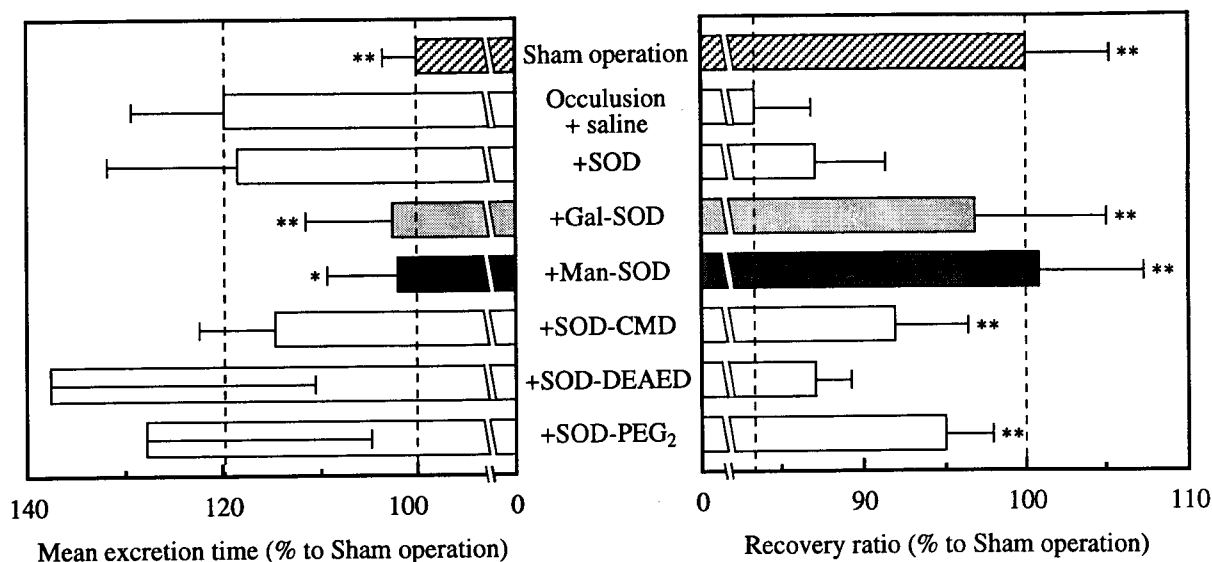


Fig. 41 Biliary mean excretion time and recovery ratio of BSP after intravenous injection of SOD derivatives in rat liver ischemia/reperfusion experiment. Results are expressed as the mean \pm SD of at least three rats. Differences were statistically evaluated by Student *t*-test against the group of saline administration before the occlusion: *, $P < 0.02$; **, $P < 0.01$.

なった。SOD-CMD、SOD-PEG₂ 投与群では排泄率に saline 投与群と比較して有意差が認められたもののその効果は糖修飾 SOD 投与群を越えることはなかった。

Ⅲ-3 考察

様々な疾患の原因として活性酸素が関与していることが明らかにされつつある¹⁴⁷⁾。また種々の病因となるだけでなく、組織が虚血状態となった後に血流が再開される臓器移植の場合にも活性酸素が発生し、活性酸素に起因する障害が発生することが明らかとなっている^{148,149)}。肝臓の虚血・再灌流時には、血管内皮細胞、Kupffer 細胞、好中球などが活性酸素を産生する可能性があると考えられるもののいずれの細胞が主要な発生源であるかは不明である。好中球やマクロファージなどの食食細胞は NADPH oxidase を形質膜に有し、種々の刺激に応答してこの酵素を活性化しスーパーオキシドアニオンを産生することが知られている^{150,151)}。また、肝血管内皮細胞表面上の xanthine dehydrogenase は虚血障害あるいは酸化障害時に xanthine oxidase に変換され、虚血組織に蓄積する xanthine を代謝する際にスーパーオキシドアニオンを発生することが報告されている¹⁵²⁻¹⁵⁵⁾。さらには、スーパーオキシドアニオンからヒドロキシラジカルなど種々の活性酸素種が生じることにより細胞機能障害が引き起こされることが報告されている¹⁵⁶⁾。

スーパーオキシドアニオンを消去する SOD は活性酸素種の代謝カスケードの上流に作用するため、ラジカル連鎖反応により産生される大量の高反応性分子種を直接消去するよりもはるかに有効な抗酸化作用が期待できる¹⁵⁷⁾。しかし分子量が 30,000 程度と比較的小さいため糸球体濾過により速やかに消失することから、その有効利用には体内動態制御が不可欠と考えられる。そこで

本研究では、SOD の体内動態制御法として糖修飾を適用し、肝臓への選択的ターゲティングによる肝臓の活性酸素障害に対する SOD の治療効果の改善を試みた。

SOD の lysine 残基に対して acetyl 化または succinyl 化修飾を施した場合には SOD の酵素活性が大幅に低下することが示されている¹⁵⁸⁾。SOD 分子表面の正電荷がスーパーオキシドアニオンの活性部位への輸送に重要な役割をしているという報告¹⁵⁹⁾もあり、acetyl 化および succinyl 化によりこの正電荷の減少することが酵素活性の低下を引き起こすものと思われる。しかし、本研究で用いた方法⁴⁶⁾による糖修飾では、第 I 章 1 節で Gal-BSA について確認したようにタンパク質の等電点を変化させることがないため¹⁰²⁾、酵素活性を十分に保持した糖修飾 SOD が合成できたものと思われる。

SOD による障害抑制効果の検討に用いた BSP は、有機アニオンの一種であり静脈内投与後胆汁中に排泄される。BSP の血漿中から肝細胞への取り込みには Na⁺ 依存的輸送系が複数関与すること¹⁶⁰⁻¹⁶²⁾、また胆管側膜を介した胆汁中への分泌には輸送能を欠損したラットを用いた検討から cMOAT (canalicular multispecific organic anion transporter) が関与していること^{163,164)}が報告されている。従って、BSP の胆汁中への排泄を指標とすることにより肝細胞の機能評価が可能であると考えられ、この方法により活性酸素による肝細胞に対する障害ならびに SOD 誘導体投与による障害抑制効果の評価を行った。

静脈内投与後肝臓へ移行した Gal-SOD、Man-SOD は、肝臓の実質細胞、非実質細胞にそれぞれ receptor-mediated endocytosis により効率よく内在化されるものと考えられる。アシアロ糖タンパク質レセプターあるいはマンノースレセプターにより取り込まれたタンパク質は lysosome へ輸送され速やかに分解されることが報告されている¹⁷⁾。しかしながら、これら両糖修飾 SOD 投与群において非常に優れた治療効果が認められたことから、細胞内に取り込まれた後少なくとも一部が SOD 活性を示し、効果発現につながったものと思われる。実際、単離した腹腔マクロファージから放出されるスーパーオキシドアニオンに対する Man-SOD の消去能の検討¹⁶⁵⁾において、colchicine 添加によりエンドサイトーシスを阻害した場合には Man-SOD の効果が認められなかったことから細胞内へ取り込まれた糖修飾 SOD が活性酸素消去に関与していることが推察される。従って、Gal-SOD は肝細胞に取り込まれ、細胞がスーパーオキシドアニオンにより障害されるのを抑制し、一方 Man-SOD は内皮細胞や Kupffer 細胞に取り込まれ、これらの細胞からスーパーオキシドアニオンが産生されるのを抑制しているのではないかとと思われる。一方、血中滞留型誘導体である SOD-CMD、SOD-PEG₂ を投与した場合にも若干の効果が認められ、長時間血漿中に存在することから肝臓通過時にスーパーオキシドアニオンを消去することが示唆された。この SOD-PEG₂ は腎臓の虚血・再灌流による障害をも抑制することが明らかとなっており¹⁶⁶⁾、その作用機序は臓器非特異的であると思われる。また、SOD-DEAED は静脈内投与後比較的肝臓へ移行するにも関わらず有意な効果は認められなかったが、これには細胞への移行パターンの違い¹⁶⁷⁻¹⁶⁹⁾や DEAED 自身の細胞への作用¹⁷⁰⁾などが影響しているのではないかとと思われる。

以上、本章では糖修飾 SOD を活性を保持したまま合成することに成功し、この修飾により SOD を効率よく肝臓へターゲティングできることを明らかにした。さらに肝臓の虚血・再灌流により発生する障害を Gal-SOD、Man-SOD を投与することにより抑制可能であることを明らかにした。こうした知見は、活性酸素に起因する様々な肝臓障害に対する糖修飾 SOD の幅広い適用性を示唆するとともに、他の生理活性タンパク質に対しても糖修飾によるターゲティングの可能性を示すものと思われる。

第IV章 体内動態の速度論的解析に基づく糖修飾タンパク質の分子設計

前章において、糖修飾を施すことにより SOD を効率よく肝臓へターゲティングすることに成功し、肝臓の虚血・再灌流障害に対する抑制効果が改善されることが明らかとなった。糖修飾はこれまでの章で示したように BSA、dextran、PLGA、SOD のいずれの高分子に対しても肝臓指向性を付与可能であったことから、この修飾法はあらゆる高分子に対して応用可能であると思われる。しかしながら、第II章でも触れたように静脈内投与後の肝臓ターゲティングは肝臓による取り込み速度のみによって決定されるのではなく、肝臓以外への消失速度とのバランスが重要となる。従って、この糖修飾を利用した細胞選択的ターゲティングが、SOD 以外の幅広い生理活性タンパク質についても適用可能であるかどうかは明らかではない。特に、分子量が小さい場合には速やかに糸球体濾過されることから¹⁷¹⁾、interferons (分子量 15,000 ~ 25,000)、interleukin 2 (分子量 15,000)、erythropoietin (分子量 30,000) など遺伝子組換え技術により開発が進められている比較的低分子タンパク質に対して、SOD 同様糖修飾によるターゲティングの実現が可能であるかどうかは明らかにされていない。さらにこうした分子量が小さいタンパク質の場合には、分子中の利用可能な官能基数が限られることからターゲティングに必要な程度の糖修飾を施せるかどうかは不明である。

そこで本章では、本研究で用いる糖修飾法を生理活性タンパク質のターゲティングに適用する場合に必要な生理活性タンパク質の物理化学的性質、ならびに糖修飾の程度の2点を明らかにするため、種々の galactose 修飾タンパク質を合成し静脈内投与後の体内動態を検討した。また、第I章で構築した生理学的薬動学モデルに基づく解析により、タンパク質の分子量と galactose による修飾率がいかにタンパク質の肝臓へのターゲティング効率に関与しているかについて検討した^{172,173)}。

Table XV Physicochemical characteristics of galactosylated proteins with different molecular weights

Compound	Apparent ^{a)} molecular weight	Number of ^{b)} NH ₂ groups (mol/mol)	Number of ^{c)} galactose residues (mol/mol)	Galactose ^{c)} content (%)
Gal ₃₈ -IgG	159,000	69.0	38.4	4.40
Gal ₂₀ -BSA	68,300	45.6	20.2	5.14
Gal ₁₁ -SOD	33,600	61.2	10.8	5.74
Gal ₆ -STI	21,300	78.9	6.04	5.12
Gal ₅ -LZM	15,200	72.9	4.82	6.03

^{a)} The apparent molecular weights of galactosylated proteins were estimated by high-performance liquid chromatography gel filtration.

^{b)} The number of amino groups was determined by trinitrobenzene sulfonic acid method.

^{c)} The galactose content was determined by anthrone-sulfuric acid method using galactose as a standard. The number of galactose residues was calculated using the molar ratio of galactose residues attached and a protein.

IV-1 galactose 修飾タンパク質の合成およびその物理化学的性質

分子量の異なるタンパク質として BSA (分子量 67,000)、SOD (分子量 32,000) の他に bovine γ -immunoglobulins (IgG: 分子量 150,000)、soybean trypsin inhibitor (STI: 分子量 20,000)、chicken egg white lysozyme (LZM: 分子量 14,000) を選択した。これまでと同様の方法により、各タンパク質に対し galactose 修飾を施した。分子量に関する検討には、糖修飾率を重量あたり 5 % 程度の galactose を含むように合成した修飾体を用いた。Table XV に合成した galactose 修飾タンパク質の物理化学的性質を示す。また、galactose による修飾率の影響については、BSA、SOD に対し galactose 残基数を変化させた修飾体を合成した (Table XVI)。動物実験には、これまでと同様の方法により ^{111}In 標識した放射標識体を用いた。

IV-2 肝移行動態に及ぼす galactose 修飾タンパク質の分子量の影響

2-a 未修飾タンパク質の静脈内投与後の体内挙動

galactose 修飾タンパク質の体内動態の検討に先立ち、用いたタンパク質固有の体内動態を検討した。Fig. 42 に 1 mg/kg の投与量で各タンパク質を静脈内投与したときの血漿中濃度と肝臓移行量を示す。分子量が大きい IgG と BSA が長時間血漿中に滞留したのに対し、分子量が 32,000 以下の SOD、STI、LZM は速やかに、また分子量に依存した速度で血漿中から消失した。また、いずれのタンパク質も殆ど肝臓へは取り込まれないことが示された。Fig. 43 に実験終了時の各タンパク質の腎臓中ならびに尿中への放射活性の回収量を示す。血漿中から速やかに消失したタンパク質はその大部分が腎臓ならびに尿中に移行していることが示され、これまでの報告^{95,96,131,171)}に

Table XVI Physicochemical characteristics of galactosylated proteins with different numbers of galactose residues

Compound	Number of ^{a)} galactose residues (mol/mol)	Galactose ^{a)} content (%)
Gal ₃₆ -BSA	35.5	8.70
Gal ₁₀ -BSA	10.2	2.67
Gal ₁₄ -SOD	14.2	7.68
Gal ₁₀ -SOD	9.78	5.21
Gal ₈ -SOD	7.83	4.21
Gal ₆ -SOD	5.84	3.18

^{a)} The galactose content was determined by anthrone-sulfuric acid method using galactose as a standard. The number of galactose residues was calculated using the molar ratio of galactose residues attached and a protein.

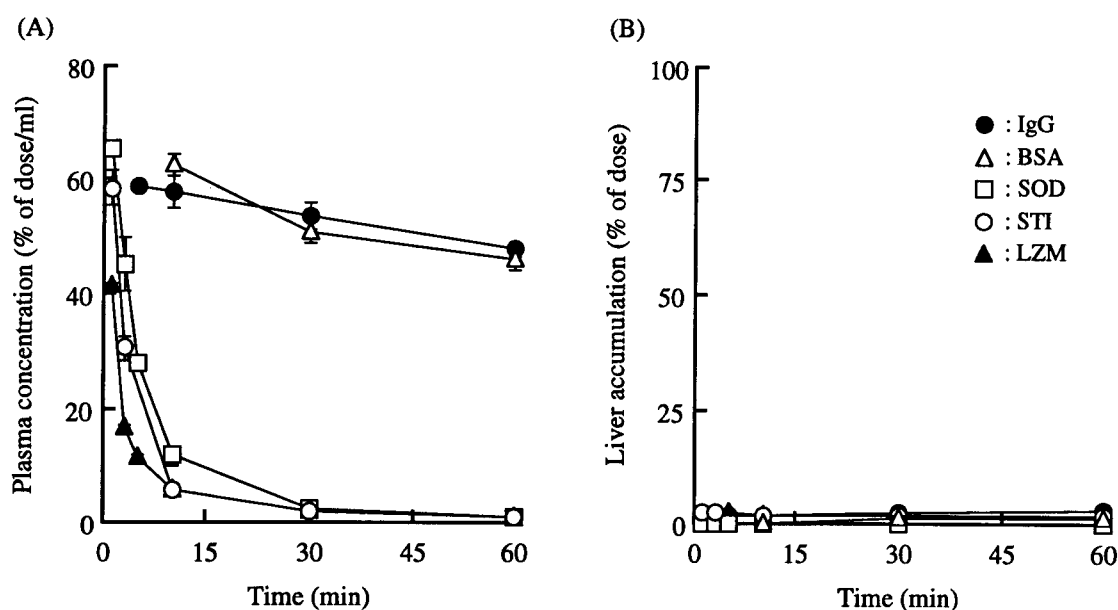


Fig. 42 Plasma concentration (A) and liver accumulation (B) of ^{111}In -labeled unmodified proteins after intravenous injection in mice at a dose of 1 mg/kg. Results are expressed as the mean \pm SD of three mice.

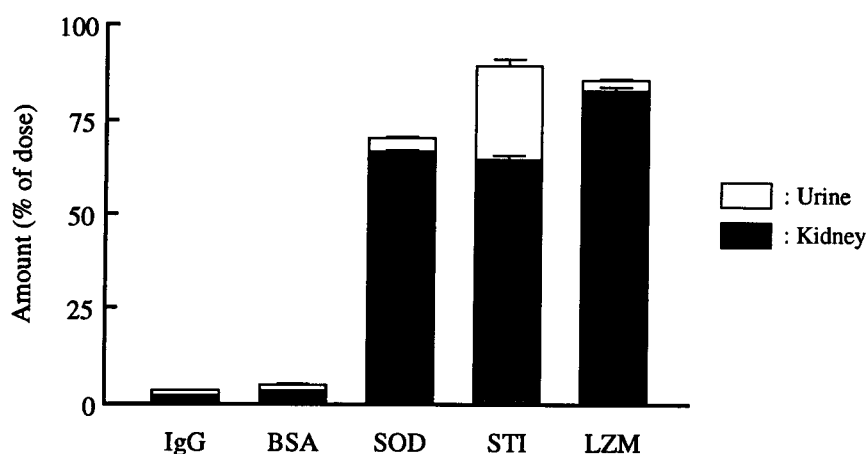


Fig. 43 Amounts of radioactivity recovered in the kidney and excreted into urine at 24 hr for ^{111}In -labeled IgG and BSA or at 1 hr for ^{111}In -labeled SOD, STI and LZM after intravenous injection in mice at a dose of 1 mg/kg. Results are expressed as the mean \pm SD of three mice.

もあるように分子量が 50,000 程度以下の高分子の場合には非特異的な糸球体濾過により血漿から消失することが確認された。

2-b galactose 修飾タンパク質の静脈内投与後の体内挙動

Table XV に示す各 galactose 修飾タンパク質をそれぞれ 0.05、0.1、1、10、20 mg/kg の投与量でマウスに静脈内投与した時の血漿中濃度と肝臓移行量を Fig. 44 に示す。1 mg/kg 以下の投与量に

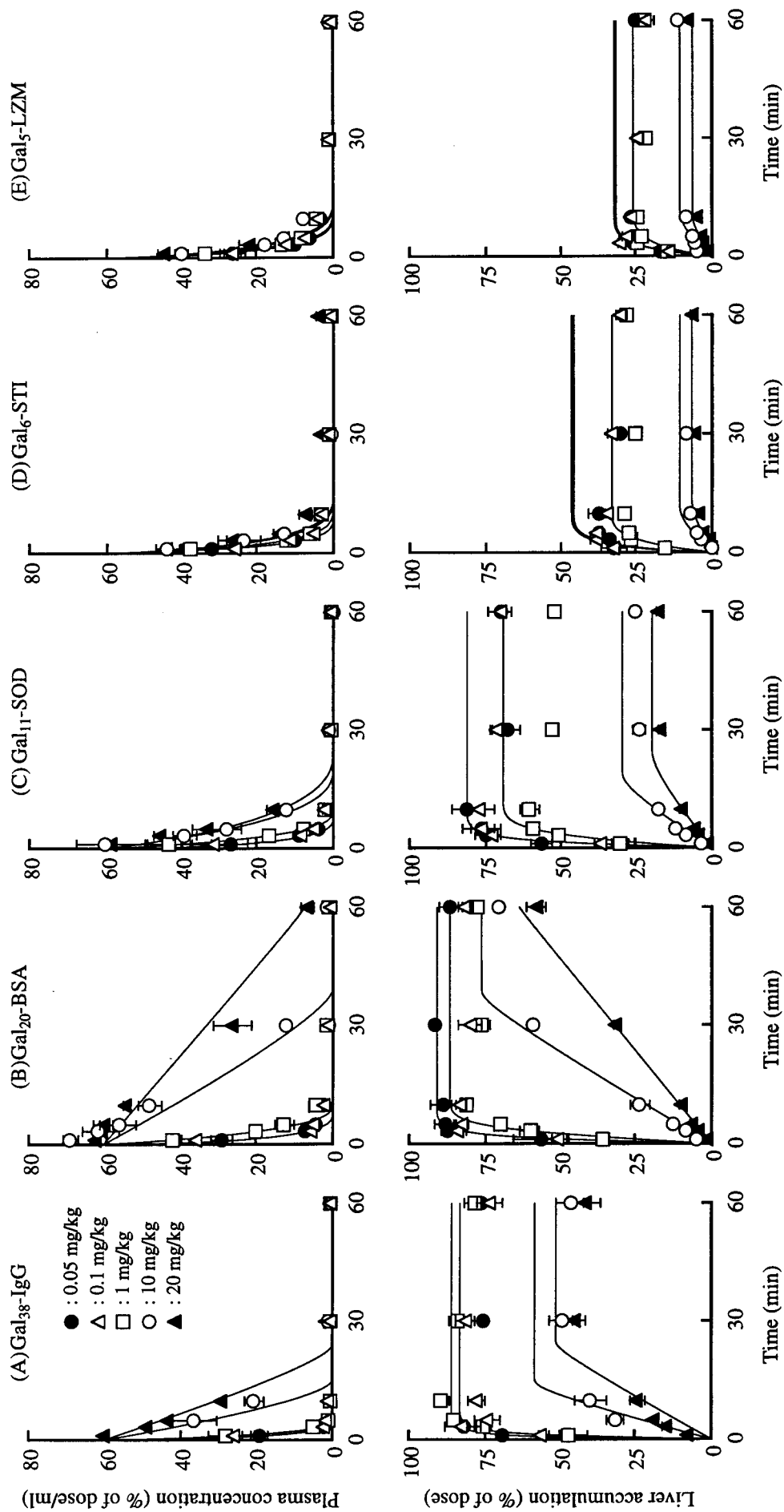


Fig. 44 Plasma concentration (*upper*) and liver accumulation (*lower*) of ^{111}In -labeled galactosylated proteins after intravenous injection in mice. Results are expressed as the mean of four mice. The curves were simulated using parameters listed in Table XIX.

において、Gal₃₈-IgG と Gal₂₀-BSA は投与後 10 分以内に投与量の 80 % 以上が肝臓へ移行した。投与量を 10 mg/kg 以上とした場合には、肝臓による取り込みが低下し、血漿からの消失も遅延した。Gal₁₁-SOD も 0.1 mg/kg 以下の投与量では投与量の 70 ~ 80 % が肝臓に移行したものの、高投与量時には Gal₃₈-IgG や Gal₂₀-BSA と比較してその肝臓移行性は大きく低下した。一方、Gal₆-STI や Gal₅-LZM は galactose 修飾により肝臓へ移行するようにはなったものの、その肝臓への移行率は他の galactose 修飾タンパク質と比べてかなり低く、それぞれ最大でも 40 %、30 % 程度しか肝臓へターゲティングできなかった。

Table XVII AUC and clearances of ¹¹¹In-labeled proteins and galactosylated proteins after intravenous injection in mice

Compound	Dose (mg/kg)	AUC (% of dose ·hr/ml)	Clearance (ml/hr)				
			CL _{total}	CL _{liver}	CL _{other} ^{a)}	CL _{urine}	CL _{kidney}
IgG	1	1440	0.069	0.016	0.054	0.005	0.002
BSA	1	1430	0.070	0.016	0.054	0.007	0.003
SOD	1	8.84	11.3	0.033	11.3	0.647	8.59
STI	1	6.39	15.7	0.355	15.3	3.84	9.77
LZM	1	4.87	20.5	0.486	20.0	0.832	17.4
Gal ₃₈ -IgG	0.05	0.86	116	88.3	28.2	0.300	0.235
	0.1	1.19	83.9	68.1	15.8	0.315	0.273
	1	1.29	77.6	64.9	12.7	0.345	0.200
	10	9.09	11.0	5.43	5.57	0.147	0.047
	20	10.8	9.26	4.15	5.11	0.102	0.080
Gal ₂₀ -BSA	0.05	1.49	67.1	61.5	5.65	0.168	0.197
	0.1	1.63	61.3	51.0	10.2	0.166	0.243
	1	3.18	31.5	25.5	6.02	0.131	0.144
	10	21.5	4.66	3.37	1.29	0.039	0.041
	20	33.0	3.03	1.99	1.04	0.040	0.033
Gal ₁₁ -SOD	0.05	1.47	67.8	55.1	12.7	6.28	4.21
	0.1	1.63	61.4	47.2	14.2	5.55	3.89
	1	2.57	38.9	23.5	15.4	5.60	4.10
	10	6.68	15.0	3.81	11.2	7.14	1.80
	20	7.93	12.6	2.21	10.4	6.35	1.37
Gal ₆ -STI	0.05	3.33	30.0	11.3	18.7	10.6	5.54
	0.1	2.70	37.0	14.3	22.7	14.1	4.65
	1	3.28	30.5	8.78	21.7	15.4	5.07
	10	4.36	22.9	1.92	21.0	17.3	3.16
	20	6.76	14.8	0.991	13.8	10.9	2.24
Gal ₅ -LZM	0.05	2.77	36.1	10.5	29.0	1.70	20.4
	0.1	3.05	32.7	10.6	24.7	1.17	18.1
	1	3.60	27.8	8.41	25.8	1.93	17.1
	10	6.56	15.2	2.57	20.0	3.99	10.3
	20	6.46	15.5	1.79	22.3	10.9	8.05

^{a)} CL_{other} was calculated by subtracting CL_{liver} from CL_{total}.

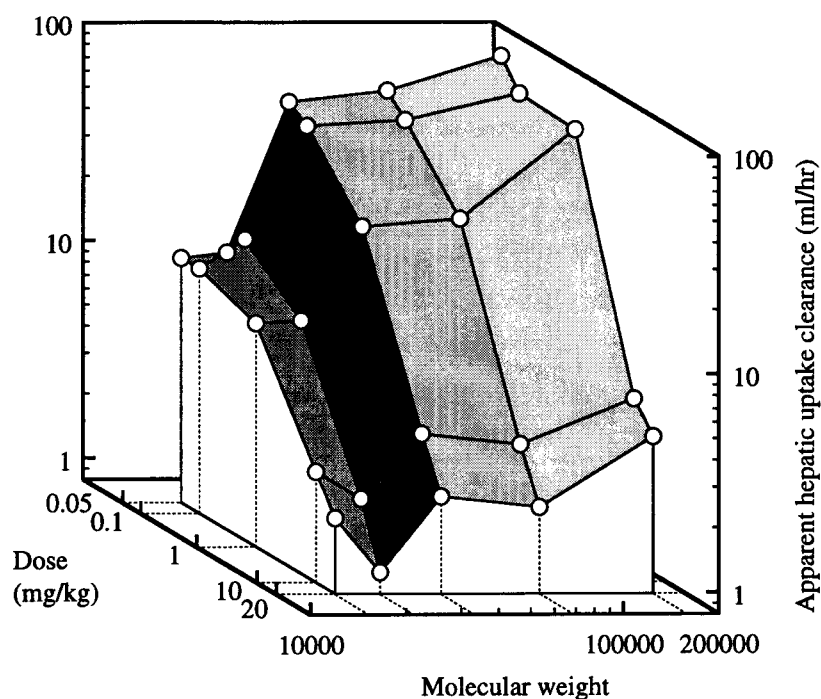


Fig. 45 Effects of the dose and the molecular weight on the apparent hepatic uptake clearances of ^{111}In -labeled galactosylated proteins. Circles represent the apparent hepatic uptake clearance of each galactosylated protein at doses from 0.05 mg/kg to 20 mg/kg.

Gal₆-STI や Gal₅-LZM 投与時、また Gal₁₁-SOD の高投与量時などには、腎臓中と尿中に高い放射活性が検出された。

2-c 体内動態の薬動学的解析

これまでと同様の方法により、各未修飾タンパク質ならびに galactose 修飾タンパク質の薬動学パラメータを算出し Table XVII にまとめた。IgG と BSA は高い血漿中滞留性を反映して非常に小

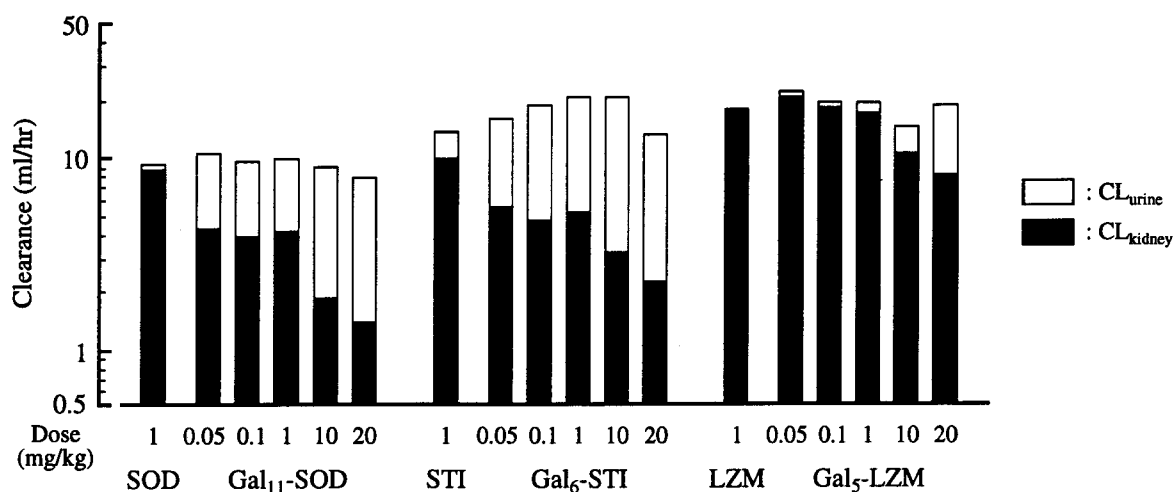


Fig. 46 Apparent kidney uptake and urinary clearances of ^{111}In -labeled proteins and their galactosylated derivatives after intravenous injection in mice.

さい CL_{total} を持つことが示された。これに対し、SOD、STI、LZM の CL_{total} は大きく、また分子量が小さいものほど大きくなる傾向が認められた。これらすべての未修飾タンパク質の CL_{liver} は 0.5 ml/hr 以下と小さく、これらタンパク質自身には肝臓に取り込まれる性質は殆どないことが示された。さらに、 CL_{kidney} と CL_{urine} に大きな違いがあり、 CL_{total} に認められる差は糸球体濾過クリアランスにより説明できることも示された。

これら肝臓への移行特性を持たないタンパク質に対し galactose 修飾を施すことにより、程度の差はあるもののいずれの場合も CL_{liver} が増加することが示された。Fig. 45 に各 galactose 修飾タンパク質の CL_{liver} を投与量と分子量に対してプロットした。Gal₃₈-IgG、Gal₂₀-BSA、Gal₁₁-SOD では、0.1 mg/kg 以下の投与量の場合には CL_{liver} はマウスの肝血漿流速⁶⁴⁾に匹敵する値であることが明らかとなった。一方、Gal₆-STI と Gal₅-LZM の CL_{liver} は低投与量の場合でも 10 ml/hr 程度であった。

SOD 以下の分子量をもつタンパク質ならびにその修飾体では、 CL_{kidney} と CL_{urine} の合計がほぼ CL_{other} に相当したことから、Fig. 46 に、SOD、STI、LZM ならびに各 galactose 修飾体の CL_{kidney} と CL_{urine} を示した。galactose 修飾による分子量の変化が殆どないことを反映し、 CL_{kidney} と CL_{urine} の和は各未修飾タンパク質と galactose 修飾体とでほぼ等しいことが示されたことから、これら誘導体に関しては galactose 修飾による肝臓以外の消失速度の変化は少ないことが示された。

IV-3 肝移行動態に及ぼす galactose 修飾タンパク質の galactose 修飾率の影響

前節において、肝臓へのターゲティングには用いるタンパク質自身の分子量が影響を及ぼすことが示された。しかし、各修飾体当たりの galactose 残基数は分子量が大きいものほど多くなっており、これが肝臓への移行性に影響していることが考えられる。これまでも、同一タンパク質に対し糖残基数を変化させた修飾体を用いた検討から、レセプター認識における糖残基数の重要性が指摘されている^{174,175)}。従って、分子量が異なるタンパク質の肝臓への取り込み特性を整理するには、この修飾率の違いも考慮する必要がある。そこで、BSA と SOD を対象に galactose 残基数の異なる修飾体を合成し (Table XVI)、その体内動態を薬動的に解析することにより肝移行動態に及ぼす galactose 修飾率の影響について検討した。

3-a 修飾率の異なる galactose 修飾タンパク質の静脈内投与後の体内挙動

Fig. 47 に修飾率の異なる Gal-SOD を 0.05 mg/kg から 20 mg/kg までの 5 段階の投与量でマウスに静脈内投与した時の血漿中濃度と肝臓移行量を示す。低投与量時の肝臓への最大移行量は誘導体間で大きく異なり、投与量の 85、75、52、28 % と SOD あたりの galactose 残基数が減少するにつれて低下した。しかし肝臓による取り込みが飽和する高投与量の場合には、肝臓への移行量にあまり顕著な差は認められなかった。

BSA 誘導体に関して同様に体内動態を検討した結果を Fig. 48 に示した。修飾率の高い Gal₃₆-

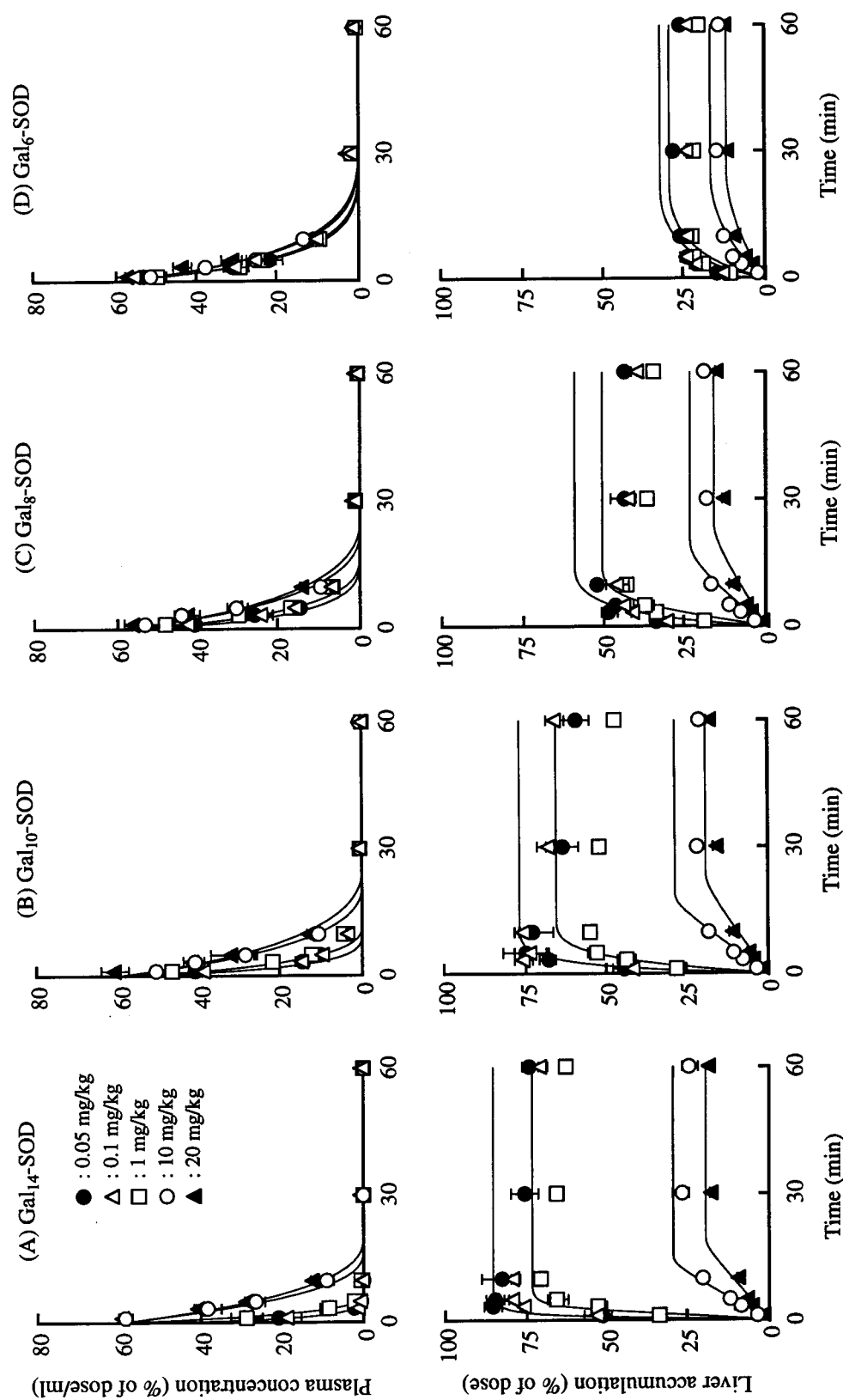


Fig. 47 Plasma concentration (*upper*) and liver accumulation (*lower*) of ^{111}In -labeled Gal-SODs after intravenous injection in mice. Results are expressed as the mean of four mice. The curves were simulated using parameters listed in Table XIX.

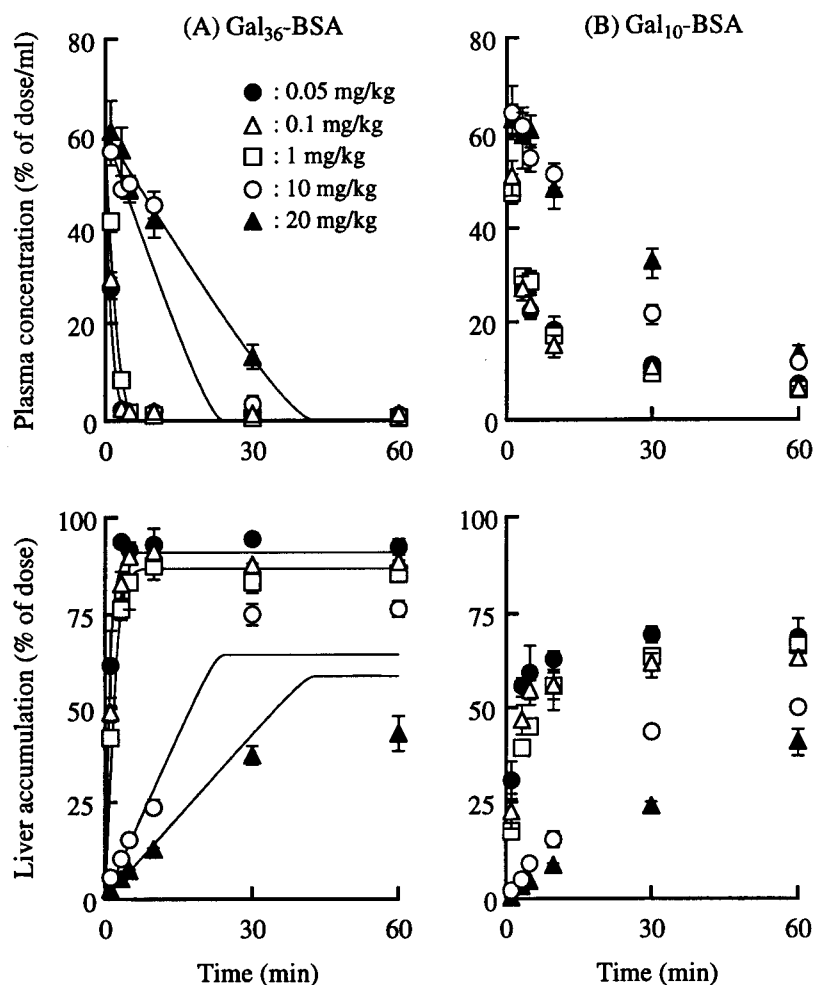


Fig. 48 Plasma concentration (*upper*) and liver accumulation (*lower*) of ^{111}In -labeled Gal-BSAs after intravenous injection in mice. Results are expressed as the mean of four mice. The curves were simulated using parameters listed in Table XIX.

BSA の血漿中からの消失ならびに肝臓への移行は、先ほどの Gal₂₀-BSA の場合とほぼ同じであることが示された。一方、Gal₁₀-BSA は投与量の約 70 % が肝臓へ移行するものの、投与した一部が長時間血漿中に滞留することが示された。

3-b 体内動態の薬動学的解析

Table XVIII に、これまでと同様の方法により求めた薬動学パラメータをまとめた。低投与量時、Gal₁₄-SOD では 80 ml/hr を越える大きい CL_{liver} であるのに対し Gal₆-SOD では 5 ml/hr 程度であり、in vivo での肝臓取り込みにおいても galactose 修飾の程度が重要であることが示された。Fig. 49 に各 galactose 修飾 SOD の CL_{liver} を SOD 一分子あたりの galactose 残基数に対してプロットした。投与量が高い場合にはあまり影響は認められないものの、低投与量時には galactose 残基数が CL_{liver} を決定する重要な要因であることが示された。同様な傾向は BSA 誘導体でも認められた。

Table XVIII AUC and clearances of ^{111}In -labeled galactosylated proteins after intravenous injection in mice

Compound	Dose (mg/kg)	AUC (% of dose ·hr/ml)	Clearance (ml/hr)				
			CL _{total}	CL _{liver}	CL _{other} ^{a)}	CL _{urine}	CL _{kidney}
Gal ₃₆ -BSA	0.05	1.12	89.6	84.6	5.00	0.109	0.275
	0.1	1.18	85.0	77.3	7.71	0.163	0.302
	1	1.93	51.9	45.4	6.52	0.062	0.210
	10	13.7	7.30	5.57	1.73	0.044	0.063
	20	18.5	5.40	2.34	3.06	0.031	0.040
Gal ₁₀ -BSA	0.05	19.7	5.08	4.80	0.280	0.079	0.062
	0.1	18.0	5.54	4.89	0.660	0.061	0.059
	1	19.5	5.14	4.95	0.190	0.055	0.060
	10	34.6	2.89	2.03	0.860	0.022	0.051
	20	42.7	2.35	1.22	1.13	0.046	0.057
Gal ₁₄ -SOD	0.05	0.96	105	86.5	18.2	7.07	1.05
	0.1	0.88	113	89.1	24.3	7.46	0.945
	1	1.44	69.2	48.7	20.5	7.96	1.45
	10	5.94	17.1	4.64	12.5	6.98	0.791
	20	7.18	13.9	2.53	11.4	4.53	0.860
Gal ₁₀ -SOD	0.05	2.56	39.1	29.3	9.8	4.22	5.17
	0.1	2.46	40.6	30.5	10.1	4.51	5.28
	1	3.32	30.2	16.5	13.7	5.36	4.80
	10	6.40	15.6	3.44	12.2	7.32	2.85
	20	7.15	14.0	2.51	11.5	7.42	1.89
Gal ₈ -SOD	0.05	3.87	25.8	13.4	12.4	2.85	7.78
	0.1	3.82	26.2	11.9	14.2	2.21	6.85
	1	4.30	23.2	10.0	13.2	3.95	7.21
	10	6.45	15.5	2.95	12.5	5.62	4.02
	20	7.46	13.4	2.02	11.4	6.15	2.60
Gal ₆ -SOD	0.05	5.33	18.8	5.26	13.5	1.74	7.60
	0.1	5.61	17.8	4.33	13.5	2.06	8.44
	1	5.30	18.9	4.19	14.7	2.16	7.26
	10	6.76	14.8	2.23	12.6	7.22	4.48
	20	7.12	14.0	1.64	12.4	6.76	3.49

^{a)} CL_{other} was calculated by subtracting CL_{liver} from CL_{total}.

IV-4 galactose 修飾タンパク質の肝移行動態を決定する要因の解明

前節までの検討により、galactose 修飾によるタンパク質の肝細胞へのターゲティングには、タンパク質の分子量と galactose の修飾率の双方が重要であることが示された。これらの要因と galactose 修飾タンパク質の肝移行動態の相関性を明らかにすることにより、その相関に基づいた誘導体の分子設計が可能となる。そこで、糖修飾 BSA の体内動態解析に用いた生理学的薬動学モデルに基づき各 galactose 修飾タンパク質の体内動態の解析を行うことにより、各修飾体の肝移行動態を 2 つの薬動学パラメータとして数値化することを試みた。さらに、得られた薬動学パラ

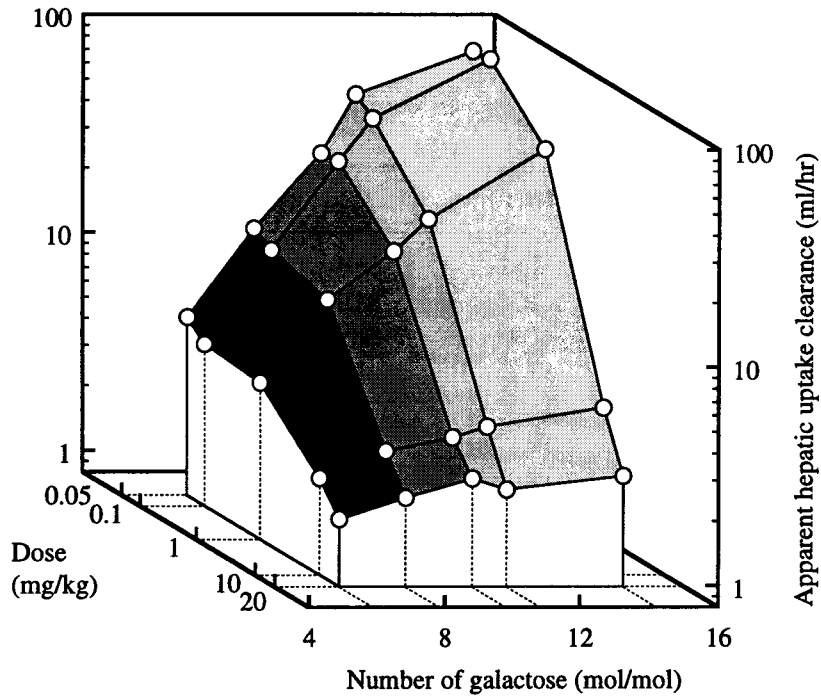


Fig. 49 Effects of the number of galactose residues on the apparent hepatic uptake clearances of ^{111}In -labeled Gal-SODs. Circles represent the apparent hepatic uptake clearance of each Gal-SOD at doses from 0.05 mg/kg to 20 mg/kg.

メータと galactose 修飾タンパク質の物理化学的性質との相関性について検討した。

4-a 生理学的薬動学モデルに基づく galactose 修飾タンパク質の体内動態解析

Fig. 50 に解析に用いたモデルを示す。PP からの消失過程以外は Fig. 13 で示した糖修飾 BSA ならびに dextran の体内動態解析に用いたモデルと同一である。Table XVII、XVIII に示した CL_{other} が $\text{Gal}_{38}\text{-IgG}$ ならびに各 Gal-BSA では投与量の増加に伴い減少したことから、これらに関しては PP からの消失を Michaelis-Menten 型 ($K_{m,p}$, $V_{\max,p}$) と仮定した。この場合には、各コンパートメントに関する物質収支式は第 I 章 3 節で示した式 (7) ~ (9) となる。一方、各 Gal-SOD、 $\text{Gal}_6\text{-STI}$ 、 $\text{Gal}_5\text{-LZM}$ の場合には CL_{other} が投与量によらずほぼ一定であったことから、PP からの消失は線形 (CL_p) であるとした。この時、各コンパートメントに関する物質収支式は以下のように記述できる。

$$\frac{dC_p}{dt} = (QC_l - QC_p - \text{CL}_p C_p) / V_p \quad (22)$$

$$\frac{dC_l}{dt} = (QC_p - QC_l - \frac{V_{\max,l}}{K_{m,l} + C_l} C_l) / V_l \quad (23)$$

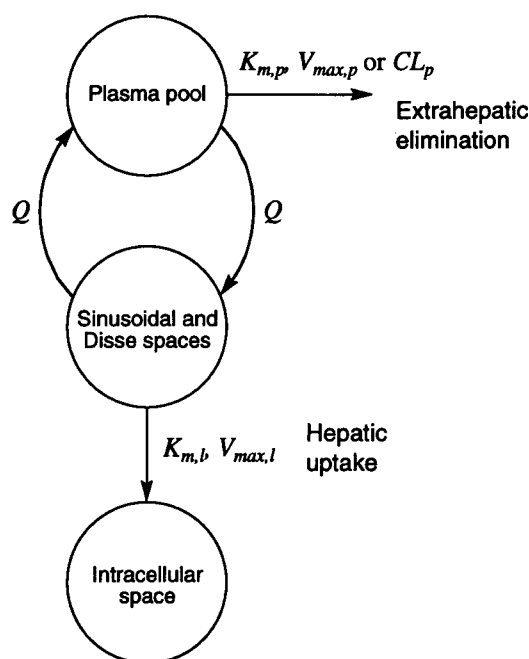


Fig. 50 Physiological pharmacokinetic model for analyzing the *in vivo* disposition of galactosylated proteins. $K_{m,l}$ and $V_{max,l}$, Michaelis constant and the maximum rate for liver uptake, respectively. $K_{m,p}$ and $V_{max,p}$, Michaelis constant and the maximum rate for extrahepatic elimination, respectively. Q , hepatic plasma flow rate. CL_p , extrahepatic clearance.

$$\frac{dX_l}{dt} = \frac{V_{max,l}}{K_{m,l} + C_l} C_l \quad (24)$$

EC および IC に関する式 (23)、(24) は、第 I 章 3 節の式 (8)、(9) とそれぞれ同一である。IgG および BSA 誘導体に関しては式 (7) ~ (9) を、それ以外については式 (22) ~ (24) を第 I 章 3 節と同様の方法で Fig. 44、47 に示す galactose 修飾タンパク質のすべての投与量での血漿中濃度 (C_p) および肝臓移行量 (X_l) に対して同時当てはめ計算を行い、 $K_{m,p}$ 、 $V_{max,p}$ 、 $K_{m,l}$ 、 $V_{max,l}$ 、 CL_p を算出した。しかし、Gal₁₀-BSA に関しては当てはめ計算において一定した収束値が得られなかった。Gal₁₀-BSA は静脈内投与後投与量の 70 % 程度は肝臓へ移行したものの投与 1 時間後においても血漿中 1 ml あたり 10 % 程度存在しており、一分子あたり 7 個しか galactose が結合していない Gal-BSA はレセプターと結合しないという報告¹⁷⁵⁾もあり、この体内動態の結果は galactose 結合数が少ないものが肝臓へ取り込まれなかったためと思われる。従って、モデル解析に用いた一組の K_m 、 V_{max} では Gal₁₀-BSA の肝臓移行動態を解析できなかったものと思われる。

解析の結果得られた体内動態パラメータを Table XIX にまとめた。各パラメータセットを用いて描いた理論曲線は各 galactose 修飾タンパク質の実験結果をよく反映していることが示された (Fig. 44、47)。肝臓による取り込みを決定する 2 つの薬動学パラメータのうち $V_{max,l}$ は各誘導体間でそれほど大きな違いは見られず、最も小さい Gal₃₈-IgG と最も大きい Gal₅-LZM の間でも 4 倍程度の差であることが明らかとなった。一方、 $K_{m,l}$ には誘導体間で大きな違いが認められた。Gal₃₈-

Table XIX Pharmacokinetic parameters of ^{111}In -labeled galactosylated proteins

Compound	Liver				Plasma		
	$K_{m,l}$ (nM)		$V_{max,l}$ (nmol/hr)	$V_{max,l}/K_{m,l}$ (ml/hr)	$K_{m,p}$ (nM)	$V_{max,p}$ (nmol/hr)	CL_p (ml/hr)
Gal ₃₈ -IgG	1.75 ± 2.88		4.23 ± 0.35	2,410	472 ± 238	7.00 ± 2.09	
Gal ₃₆ -BSA	6.33 ± 4.01		6.20 ± 0.37	980	839 ± 351	7.07 ± 1.56	
Gal ₂₀ -BSA	22.0 ± 5.5		4.69 ± 0.29	213	301 ± 167	2.01 ± 0.54	
Gal ₁₀ -BSA ^{a)}	—		—	—	—	—	
Gal ₁₄ -SOD	8.22 ± 5.23		9.84 ± 0.59	1,200			14.9 ± 0.9
Gal ₁₁ -SOD	64.2 ± 12.9		8.72 ± 0.70	136			12.7 ± 0.8
Gal ₁₀ -SOD	118 ± 23		8.78 ± 0.89	74.5			12.4 ± 0.9
Gal ₈ -SOD	360 ± 69		8.60 ± 1.15	23.9			13.1 ± 1.0
Gal ₆ -SOD	1,240 ± 310		8.63 ± 1.83	6.95			13.5 ± 0.8
Gal ₆ -STI	242 ± 54		9.73 ± 1.42	40.2			32.2 ± 2.0
Gal ₅ -LZM	922 ± 230		18.0 ± 3.5	19.5			34.6 ± 2.2

Each parameter was calculated based on the model (Fig. 13) and was obtained by fitting the differential equations (7)-(9) to experimental data of plasma concentration and liver accumulation time courses of each ^{111}In -labeled glycosylated BSA at five doses. $K_{m,l}$ and $V_{max,l}$, Michaelis constant and the maximum rate for liver uptake, respectively. $K_{m,p}$ and $V_{max,p}$, maximum rate of uptake for liver and plasma, respectively. CL_p , extrahepatic clearance.

^{a)} ^{111}In -labeled Gal₁₀-BSA was not analyzed based on the model.

IgG、Gal₃₆-BSA、Gal₁₄-SOD など肝臓へ効率よく速やかに取り込まれたものではその値は数 nM と算出された。この時、 $V_{max,l}/K_{m,l}$ で表される肝臓取り込みの固有クリアランスは 980 ~ 2,400 ml/hr となり肝血漿流速 (85 ml/hr)⁶⁴⁾と比較して 10 倍以上大きく、これら誘導体の低投与量での肝臓取り込みが血流速度であることが明らかとなった。しかし、Gal₆-SOD では $K_{m,l}$ は 1.2 μM となり、Gal₃₈-IgG と比較して 1,000 倍近い開きがあることが示された。

4-b galactose 修飾タンパク質の薬動学パラメータと galactose 修飾率との相関

前項において、生理学的薬動学モデルに基づく解析により galactose 修飾タンパク質の in vivo で肝移行動態の薬動学的特性を明らかにすることができた。解析により得られた薬動学パラメータと galactose 修飾タンパク質の物理化学的性質との相関性について、先ず分子量の影響を無視できる 5 種類の Gal-SOD に焦点を絞り、galactose 残基数の影響について検討した。Fig. 51 に各 Gal-SOD の $K_{m,l}$ と $V_{max,l}$ を SOD 一分子あたりの galactose 残基数に対して片対数プロットした。その結果、 $K_{m,l}$ の対数値と galactose 残基数の間には非常に良好な相関が認められた。従って、同一タンパク質に限定した場合には一分子あたりの galactose 残基数が誘導体の $K_{m,l}$ を決定し、その結果として肝臓による取り込み速度が決定されることが示された。

そこで、検討に用いたすべての galactose 修飾タンパク質に対し galactose による修飾率と $K_{m,l}$ と

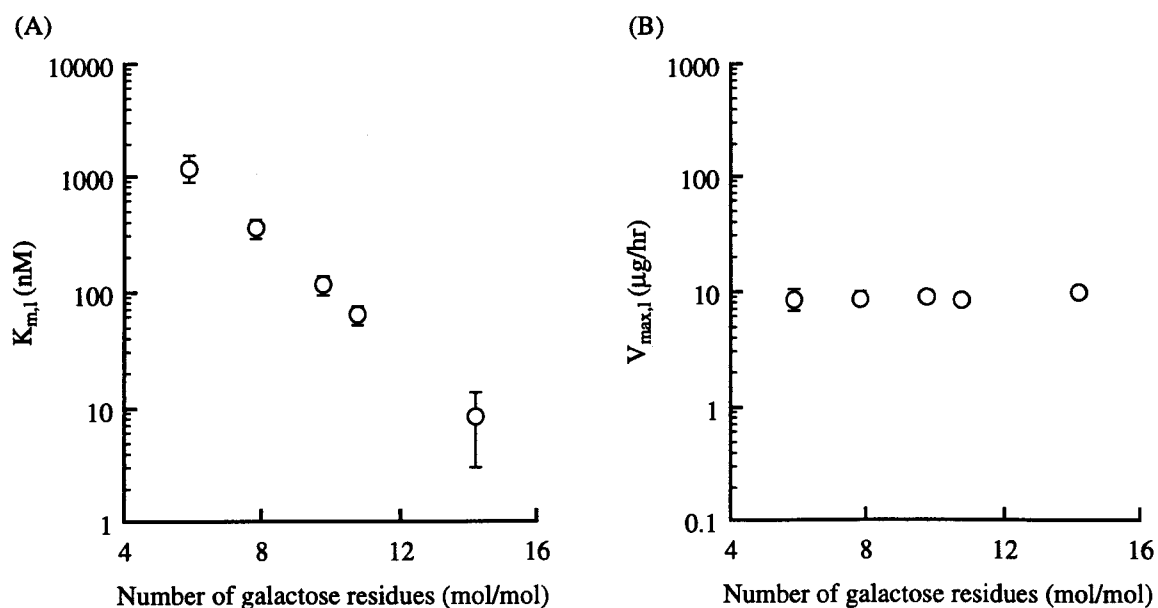


Fig. 51 Effect of the number of galactose residues on pharmacokinetic parameters representing the hepatic recognition of ^{111}In -labeled Gal-SOD. $K_{m,i}$ (A) and $V_{max,i}$ (B) of ^{111}In -labeled Gal-SOD were plotted as means \pm SD against the number of galactose residues per each Gal-SOD.

Table XX Estimated surface area and surface density and distance of galactose residues in galactosylated proteins

Compound	Estimated ^{a)} surface area	Surface density ^{b)} of galactose (molecule/Å ²)	Distance between ^{c)} galactose residues (Å)
Gal ₃₈ -IgG	37,800	1.02	31.4
Gal ₃₆ -BSA	21,000	1.69	24.3
Gal ₂₀ -BSA	21,000	0.962	32.2
Gal ₁₀ -BSA	21,000	0.486	45.4
Gal ₁₄ -SOD	12,200	1.16	29.4
Gal ₁₁ -SOD	12,200	0.882	33.7
Gal ₁₀ -SOD	12,200	0.798	35.4
Gal ₈ -SOD	12,200	0.639	39.6
Gal ₆ -SOD	12,200	0.477	45.8
Gal ₆ -STI	8,720	0.692	38.0
Gal ₅ -LZM	6,800	0.708	37.6

^{a)} The surface areas were calculated by the following equation using the molecular weights of native proteins:

$$\text{Surface area} = 6.3 \times (\text{Molecular weight})^{0.73}$$

^{b)} The surface density of galactose residues was calculated by dividing the number of galactose residues by the surface area.

^{c)} The distance between the vicinal galactose residues was calculated by the following equation:

$$\text{Distance} = (\text{Surface area}/\text{Number of galactose})^{0.5}$$

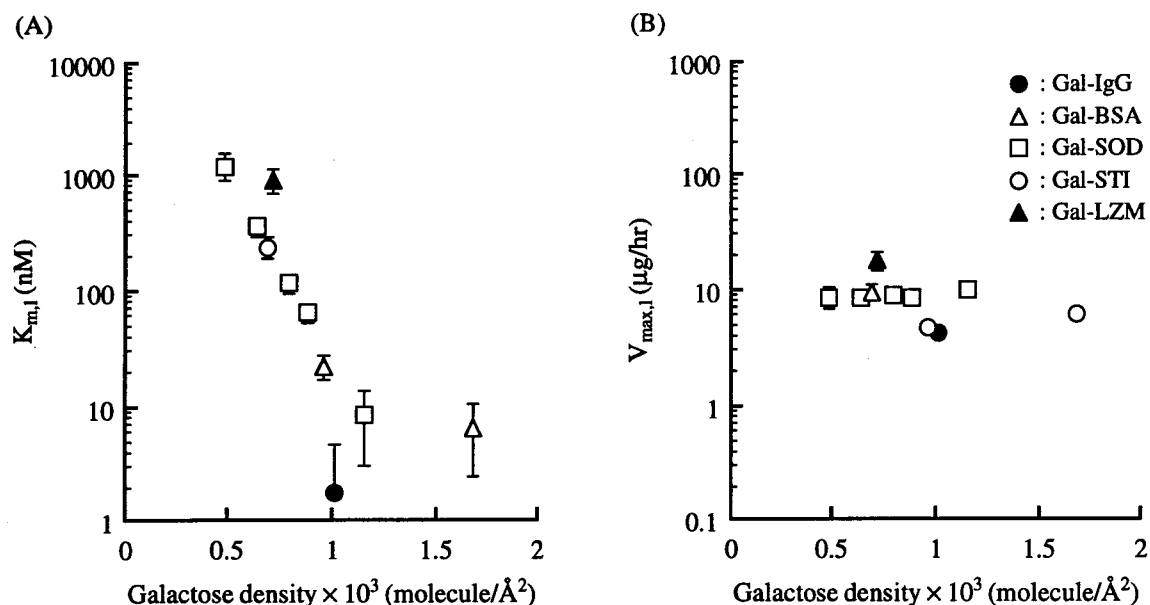


Fig. 52 Relationship between $K_{m,l}$ (A) or $V_{max,l}$ (B) and the surface density in ^{111}In -labeled galactosylated proteins. Parameters of ^{111}In -labeled galactosylated proteins were plotted as means \pm SD against the surface density of galactose residues

の関係が成り立つかどうかについて検討した。但し、誘導体間で大きく分子サイズが異なること、またアシアロ糖タンパク質レセプターによるリガンド認識においては galactose 分子の立体配置が重要であること¹⁵⁻¹⁸⁾を考慮し、galactose 修飾率の指標として誘導体表面の galactose 残基の密度を用いた。galactose の表面密度は、Miller らの方法¹⁷⁶⁾に従い各タンパク質の露出表面積を算出し、各誘導体一分子あたりの galactose 残基数をこの表面積で除すことにより galactose の分子表面密度を見積もった (Table XX)。 $K_{m,l}$ 、 $V_{max,l}$ を galactose の表面密度に対して片対数プロットしたところ (Fig. 52)、 $K_{m,l}$ の対数値は galactose の表面密度の増加に伴いほぼ直線的に減少し、表面密度が 1×10^{-3} molecule/ \AA^2 以上ではほぼ一定値となることが示された。この結果は、galactose 修飾タンパク質の肝臓取り込みはタンパク質のサイズに依らず galactose の分子表面密度によって決定されることを示唆するものである。従って、この相関に基づいた galactose 修飾タンパク質を設計することにより肝細胞へのターゲティングに適した誘導体の開発が可能になると思われる。

IV-5 考察

糖修飾による生理活性タンパク質の肝臓ターゲティングは、肝臓取り込み速度と肝臓以外への消失速度とのバランスによって決定される。従って、糖修飾タンパク質の肝臓への移行を in vivo で評価することによりこの両過程を同時に評価することが可能であり、得られた情報をもとに静脈内投与後の肝臓移行に優れた誘導体の設計が実現できるものと考えられる。また、静脈内投与後の体内動態を生理学的薬動学モデルに基づいて解析することにより、in vivo におけるアシアロ糖タンパク質レセプターを介する取り込みの薬動学的情報を得ることができ、この取り込み特性

と galactose 修飾タンパク質の物理化学的性質との相関を明らかにすることができた。

アシアロ糖タンパク質レセプターの基質認識に関しては、これまでに *in vitro* 遊離肝細胞を用いた検討などから糖鎖上の galactose 分子の立体配置の重要性が明らかとされており、3 分岐の糖鎖末端の galactose が形成する $15 \text{ \AA} \times 22 \text{ \AA} \times 25 \text{ \AA}$ の三角形の形状がアシアロ糖タンパク質レセプターとの結合に優れているといわれている¹⁵⁻¹⁸⁾。一方、合成的にも簡便であり、また BSA などに対しては十分な肝臓指向性を付与できることから、本研究で用いたような単糖修飾法は肝臓指向型タンパク質や高分子キャリアーの開発などに有用である。この単糖修飾の場合には、BSA 分子に結合させる galactose 残基数を増加させるほど結合親和性が増大することが報告されており^{174,175)}、本研究においても第Ⅱ章での Gal-PLGA を用いた検討から galactose 残基数の重要性が *in vivo* での肝臓取り込みにおいても実証されている。しかし、分子量などの物理化学的性質が異なる高分子間でレセプター結合における糖修飾率、糖残基数などの持つ意味は明らかではなく、生理活性タンパク質などの高分子に対してターゲティングを目的とした糖修飾を試みる際の分子設計に関する情報は得られていない。体内動態の解析を通じて高分子固有の特性—修飾による糖残基の導入率—肝臓取り込み速度の関係を整理可能となれば、肝臓以外への消失に関する情報と総合することにより合理的な糖修飾を利用したターゲティングが達成できるものと思われる。

そこで本章では、生理活性タンパク質を対照として静脈内投与後の体内動態を生理学的薬動学モデルで解析することにより、galactose 修飾タンパク質の肝移行動態を決定する要因の解明を試みた。解析の結果、Gal₃₈-IgG、Gal₃₆-BSA、Gal₁₄-SOD など低投与量時に非常に速やかに肝臓に取り込まれる誘導体では、 $K_{m,l}$ は非常に小さくまた大きな標準偏差を持つことが示されたが、これは $K_{m,l}$ が非常に小さい場合には肝臓取り込みが低投与量時には血流律速となっているためであり、このような条件下では $K_{m,l}$ の多少の変動は肝臓移行動態に殆ど影響を及ぼさないためであることが推察された。このことから、galactose による修飾率を表面密度として $1 \times 10^{-3} \text{ molecule/\AA}^2$ 以上にすることが可能であれば、血流速度に近い速度で肝臓へ送達可能な誘導体が設計できることが示唆された。各 galactose 修飾タンパク質表面の galactose 残基の分布が均一であると仮定したときの galactose 残基間の距離を Table XX に示す。肝臓へ効率よく移行した誘導体では、galactose 残基間の距離は 30 \AA 以下でとなり、前述した糖鎖上の galactose 分子の立体配置の値とほぼ等しいことが示された。このことは、分子量をもとに推定したタンパク質の露出表面積から算出した galactose の表面密度を指標とすることにより、アシアロ糖タンパク質レセプターに効率よく認識される誘導体が設計可能であることを示唆するものである。

STI、LZM ではレセプターへの affinity を十分高めることができず、また同時に全身動態特性として糸球体濾過速度が大きいことから期待にかなう肝臓ターゲティングは達成できなかった。このような場合には、糖修飾による肝臓指向性の付与だけでなく、肝臓以外への消失を抑制する化学修飾を併用することで肝臓への効率の良いターゲティングを実現するものと考えられる。

以上、本章では種々の糖修飾タンパク質の体内動態をモデルに基づき解析することにより、タ

ンパク質分子表面の galactose 残基の密度が galactose 修飾タンパク質の肝臓取り込み過程の affinity を決定していることが示唆され、糖修飾を利用して生理活性タンパク質ならびに高分子キャリアーを肝臓へターゲティングする際に必要な誘導体の設計に関する指針を得ることができた。これらの知見は、物理化学的性質の異なる種々の生理活性タンパク質に対して糖修飾を利用した細胞選択的ターゲティングを試みる上で有益な情報を与えるものと思われる。

結 論

以上、著者は四章にわたり、糖修飾高分子の物理化学的性質と体内動態特性との関連を基盤として、糖修飾を利用したターゲティングシステムの合理的な設計指針の確立に取り組み、糖修飾 BSA を用いて糖修飾高分子の基本的な体内動態特性を薬動学的解析を通じて明らかにした後、低分子薬物および生理活性タンパク質の肝臓選択的ターゲティング法の開発を試み、さらに種々の galactose 修飾タンパク質の体内挙動の薬動学的解析によりタンパク質医薬品の分子設計に関しても検討を行った結果、以下の結論を得た。

(I) 糖修飾 BSA 誘導体を用いた糖修飾高分子の体内動態特性の解明

モデル高分子として静脈内投与後長時間血漿中に存在する BSA を選択し、糖修飾高分子の体内動態特性を明らかにするため、糖修飾 BSA の静脈内投与後の臓器分布特性を薬動学的手法を用いて解析した。組織分布の指標となる組織取り込みクリアランスを算出するには、組織移行後放射標識体の組織からの efflux が無視可能な ^{111}In 標識法が適していることが示された。この方法で標識した放射標識体を用いて体内動態を検討した結果、Gal-BSA は肝臓の血漿流速とほぼ等しい速度で肝臓の実質細胞に取り込まれること、一方 Man-BSA は肝臓の非実質細胞と脾臓へ多く回収されたことから、それぞれの糖を認識するレセプターの分布と一致することが示された。また、Michaelis-Menten 型の肝臓取り込み過程を組み込んだ生理学的薬動学モデルを用いて解析することにより糖修飾 BSA ならびに dextran の非線形肝臓取り込みを定量的に評価できることも示された。

(II) 肝臓指向性キャリアーの開発とそれを利用した薬物ターゲティング

水溶性が高く化学修飾可能な反応基を多く有し、またタンパク質と比較して抗原性が低いなどの利点を有する dextran をキャリアー骨格として選択し、応用性の広い細胞選択的キャリアーシステムの開発を試みた。前章において dextran が低投与量条件下に肝実質細胞に取り込まれることが明らかとなったことから、これを防ぐため carboxymethyl 基を導入した CMD をキャリアー骨格として Gal-CMD、Man-CMD を合成した。両糖修飾体は、それぞれ肝実質細胞、非実質細胞に対して極めて高い特異性を有するキャリアーであることが示され、抗癌剤シタラビンに対し肝臓への選択的なターゲティングが実現された。さらに、生体内で速やかに分解されるため速やかな薬物放出が期待できる poly-L-glutamic acid (PLGA) を用いて肝細胞選択的キャリアー (Gal-PLGA) を合成し、これに結合することにより vitamin K₅ を効率よく肝細胞へターゲティングできることを明らかにし、この vitamin K₅ のターゲティングにより低プロトロンビン血症を誘発させたマウスの血液凝固能を速やかに回復できることが示された。

(III) 糖修飾による SOD の肝臓ターゲティングと虚血・再灌流障害に対する治療効果改善

糖修飾を利用した細胞選択的ターゲティングを生理活性タンパク質の動態制御へ応用することを試み、活性酸素除去酵素である SOD に対し、galactose および mannose 修飾を施し、肝臓へ選択的にターゲティングされる誘導体を合成した。肝臓への血流を一定時間遮断後再灌流することにより肝臓障害モデルを作成し、静脈内投与した BSP の胆汁中への排泄を指標に SOD 誘導体の障害抑制能を評価した結果、SOD および高分子結合型 SOD 誘導体投与群と比較して両糖修飾 SOD 投与群では胆汁排泄能の回復が認められ、タンパク質医薬品に対しても糖修飾によるターゲティングが有効であることが示された。

(IV) 体内動態の速度論的解析に基づく糖修飾タンパク質の分子設計

臨床応用が期待されているタンパク質医薬品の多くは、分子量が比較的小さく速やかに糸球体濾過される。糖修飾高分子の標的部位への送達効率は、標的細胞による取り込み速度と標的以外への消失速度とのバランスによって決定されることから、ターゲティングに適した糖修飾タンパク質の設計には、両過程の速度と糖修飾タンパク質の物理化学的特性との関係を明らかにする必要がある。そこで、モデルタンパク質として BSA (分子量 67,000)、SOD (分子量 32,000) に加え、IgG (分子量 150,000)、STI (分子量 20,000)、LZM (分子量 14,000) を選択し、各 galactose 修飾体の体内動態特性を検討した。いずれの場合も galactose 修飾により肝臓への移行増大が認められたが、STI および LZM 誘導体では投与量の 30 ~ 40 % しか肝臓へターゲティングできないことが示された。これに対して分子サイズの大きいタンパク質では肝臓移行量が 80 % に達し、また galactose 残基数を増加させることで肝臓へのターゲティング効率が上昇することも明らかとなった。さらに、galactose 修飾タンパク質の構造と肝臓ターゲティング効率との関係を第 I 章で構築した薬動学モデルを用いて解析した結果、タンパク質分子表面の galactose 残基密度が galactose 修飾タンパク質の肝臓取り込み過程の affinity を決定していることが示唆された。

以上、著者は糖修飾高分子の一般的な体内動態特性を糖修飾 BSA を用いて整理し、次に糖修飾高分子の体内動態解析に有用な生理学的薬動学モデルを構築した。また、dextran および PLGA を骨格とする細胞選択的キャリアーシステムを開発し、薬物ターゲティングへの適用に成功した。さらに、SOD を糖修飾により肝臓へターゲティングすることで治療効果が改善されることを示し、タンパク質医薬品の肝臓指向型誘導体化に関する設計指針を得た。これらの知見は、低分子薬物やタンパク質医薬品、さらには遺伝子やアンチセンスオリゴヌクレオチドなどに対する細胞選択的ターゲティングシステムの開発に有益な設計指針を提供するものと思われる。

謝 辞

終わりに臨み、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都大学橋田 充教授、並びに長らく御指導を賜りました京都大学瀬崎 仁名誉教授に衷心より深甚なる謝意を表します。また、多くの有益な御助言と御指導を戴いた京都大学高倉喜信助教授に心から感謝の意を表します。さらに、種々の貴重な御助言を賜りました長崎大学西田孝洋助教授、京都薬科大学藤田卓也助手、京都大学山下富義助手、明治薬科大学三原 潔助手、日本農薬医薬研究所大坪祥人主任ならびに京都大学薬学部薬剤学教室員一同に深く感謝します。

さらに、実験の一部に御協力戴いた、小山靖夫修士、上条彰子学士、平林英樹修士、宮崎千鶴学士、竹村栄生学士、長谷川晋学士に深く感謝します。

実験の部

第 I 章 実験の部

【1】試薬

bovine serum albumin (fraction V、BSA) は Sigma 社より購入した。平均分子量 70,000 の dextran は Pharmacia 社より購入した。 $[^{111}\text{In}]\text{InCl}_3$ は日本メジフィジックス株式会社より供与されたものを用いた。 $\text{Na}[^{125}\text{I}]$ は第一化学薬品株式会社より、 $[^{14}\text{C}]\text{KCN}$ は Amersham 社より購入した。diethylenetriaminepentaacetic dianhydride (cDTPA)、1-(4-isothiocyanobenzyl)ethylenediaminetetraacetic acid (SCN-Bz-EDTA) は同人化学研究所より購入した。

【2】糖修飾 BSA の合成

galactose 修飾 BSA (Gal-BSA) は、Lee らの方法⁴⁶⁾に従い合成した。galactose 7.5 g を acetic anhydride 10 ml 中室温で 3 時間攪拌後、30 % HBr/AcOH 20 ml 中冷所で一晚インキュベーションしアセトハロ糖を調製した。次いで、これを thiourea と 1:1 のモル比で acetone に溶解後 15 分間還流し、反応生成物 4.5 g と ClCH_2CN 3.33 g、 K_2CO_3 1.49 g、 NaHSO_3 1.95 g を水/acetone (1:1) 20 ml 中で 2 時間氷冷下で反応させ、cyanomethyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thiogalactoside (CNM-thiogalactoside) を合成した。得られた CNM-thiogalactoside を MeOH 中 0.01 M CH_3ONa と室温で一晩インキュベーションし 2-imino-2-methoxyethyl 1-thiogalactoside (IME-thiogalactoside) を合成した。最終的に、BSA 50 mg を含む 50 mM borate buffer (pH 8.5) 5 ml に IME-thiogalactoside を適当なモル比で加え、3 時間反応させることにより Gal-BSA を合成し、Sephadex G-25 (Pharmacia 社) カラムを用いたゲル濾過により精製した。mannose 修飾 BSA (Man-BSA)、glucose 修飾 BSA (Glc-BSA) はそれぞれ mannose、glucose を出発物質とし Gal-BSA と同様の方法で合成した。

【3】糖修飾 BSA の物理化学的性質の評価

(1) 糖残基数の定量

galactose、mannose、glucose をそれぞれ標準物質として anthrone-硫酸法¹⁷⁷⁾により行った。

(2) 等電点

Gal-BSA の等電点は、polybuffer exchanger 94 resin (Pharmacia 社) を用いて polybuffer 74 により溶出し、溶出液の pH を測定することにより定量した。

(3) タンパク質の定量

BSA を標準物質として Lowry らの方法¹⁷⁸⁾に準じて定量した。

【4】放射標識体の合成

(1) ^{111}In -DTPA 標識

Hnatowich らの方法⁴⁷⁾に従い二官能性キレート試薬 cDTPA を用いて $[^{111}\text{In}]\text{InCl}_3$ により放射標識した。タンパク質 2 ~ 10 mg を 0.1 M HEPES buffer (pH 7.0) 1 ml に溶解し、DMSO に溶解した cDTPA を 10 μl (タンパク質の 2 倍当量) 加え、30 分間室温で反応させた後、Sephadex G-25 カラムを用いたゲル濾過により未反応 cDTPA を除去、限外濾過により濃縮した。次いで、0.1 M acetate buffer (pH 6.0) 20 μl と $[^{111}\text{In}]\text{InCl}_3$ 溶液 (74 MBq/ml) 20 μl の混液に 40 μl の cDTPA 結合タンパク質を加え 30 分間室温で放置することにより標識を行った。Sephadex G-25 カラムを用いたゲル濾過および限外濾過により精製した。

(2) ^{111}In -Bz-EDTA 標識

Meares らの方法⁴⁹⁾に従い二官能性キレート試薬 SCN-Bz-EDTA を用いて $[^{111}\text{In}]\text{InCl}_3$ により放射標識した。タンパク質 10 mg を 50 mM borate buffered saline (pH 8.5) 1 ml に溶解し、DMF に溶解した SCN-Bz-EDTA を 15 μl (タンパク質の 10 倍当量) 加え、37 °C で一晩反応させた後、Sephadex G-25 カラムを用いたゲル濾過により未反応 SCN-Bz-EDTA を除去、限外濾過により濃縮した。次いで、0.1 M acetate buffer (pH 3.0) 20 μl と $[^{111}\text{In}]\text{InCl}_3$ 溶液 (74 MBq/ml) 20 μl の混液に 40 μl の SCN-Bz-EDTA 結合タンパク質を加え 1 時間室温で放置することにより標識を行い、Sephadex G-25 カラムを用いたゲル濾過および限外濾過により精製した。

(3) ^{125}I 標識

$\text{Na}[^{125}\text{I}]$ を用い、chloramine-T 法⁵⁰⁾により行った。標識体は Sephadex G-25 カラムを用いたゲル濾過により精製し、未反応の ^{125}I を除去した後実験に用いた。ゲル濾過の溶出液には 0.2 % BSA 含有 0.25 M phosphate buffer を用いた。

(4) ^{14}C -dextran

Isbell らの方法⁹³⁾により ^{14}C -dextran ([carboxyl- ^{14}C]-dextran) を合成した。dextran 1.4 g を精製水 10 ml に溶解し、酸性条件下 $[^{14}\text{C}]\text{KCN}$ を 0.05 mmol 加え 50 °C で 7 時間加熱した後、45 °C で 24 時間放置した。反応生成物を Sephadex G-25 カラムを用いたゲル濾過により精製し、限外濾過法により濃縮した。

【5】静脈内急速投与後の体内挙動

(1) 組織分布実験

各高分子の体内挙動は ddY 系雄性マウス (5 ~ 6 週齢、24 ~ 28 g) を用いて行った。放射標識体の生理食塩水溶液を尾静脈より投与後、代謝ケージ内で飼育し、尿、糞を採取した。経時的に大静

脈採血により屠殺し、血漿中あるいは各組織中の放射活性を測定した。また、 ^{111}In -DTPA-BSA を用いて同様の実験を行い、投与 10 分後の組織中濃度を測定し、組織中の残存血液量を補正した。また、標識体を尾静脈内投与後マウスを pentobarbital 麻酔下開腹し、門脈から collagenase 0.5 mg/ml を含む緩衝液で肝臓を灌流し、得られた細胞懸濁液を冷却遠心することにより実質細胞と非実質細胞とに分離した⁵⁸⁾。各細胞画分の放射活性ならびに細胞数を測定することにより各肝臓構成細胞への分布を評価した。

(2) 糖修飾 BSA の同時投与実験

^{111}In 標識糖修飾 BSA (1 mg/kg) を非標識糖修飾 BSA (10 mg/kg) と同時に尾静脈内投与した。投与 5 分 (^{111}In -Gal-BSA、 ^{111}In -Glc-BSA) あるいは 10 分後 (^{111}In -Man-BSA) に血漿ならびに肝臓を採取し、放射活性を測定した。

(3) ^{14}C -dextran と Gal-BSA の同時投与

^{14}C -dextran (1 mg/kg) を非標識 Gal-BSA (30 mg/kg) と同時に尾静脈内投与し、経時的に血漿ならびに肝臓を採取し放射活性を測定した。

【6】トリクロロ酢酸 (TCA) 沈殿法

^{125}I -Gal-BSA 静脈内投与後の血漿サンプルにのみ適用した。採取した血漿 200 μl に等量の 45 % TCA 溶液を加え、直ちに冷却遠心 (3,000 rpm \times 10 分、4 $^{\circ}\text{C}$) し上清と沈殿物中の放射活性を測定した。投与に用いた ^{125}I -Gal-BSA の放射活性はこの操作により 99.6 % が沈殿物中に回収された。

【7】モデル高分子の定量 (放射活性の測定)

(1) ^{111}In および ^{125}I 標識体

カウンティングチューブにサンプリング後、特別な操作は行わずにそのまま well 型 γ 線シンチレーションカウンター (ARC-500、Aloka 社) で測定した。

(2) ^{14}C 標識体

生体組織中の ^{14}C の放射活性は、サンプル 50 ~ 200 μg に対し Soluene-350 (Packard 社) で可溶化し、2 N 塩酸で中和後液体シンチレーション用メディウム (Clear-sol I、ナカライテスク社) を 5 ml 加え、液体シンチレーションカウンター (LSC-5000C、Beckman 社) により測定した。

第Ⅱ章 実験の部

【1】試薬

平均分子量 25,000 の poly-L-glutamic acid (PLGA) は Sigma 社より購入した。[5-³H]cytosine β-D-arabinoside (³H-ara-C) は Amersham 社より購入した。

【2】dextran 誘導体の合成

(1) carboxymethyl-dextran (CMD) の合成

強アルカリ条件下、dextran 1 g を精製水 50 ml に溶解し、monochloroacetic acid 2 g を加え、70 °C で 20 分間反応させた。反応終了後、精製水中で一昼夜透析し、限外濾過により濃縮後、凍結乾燥した。

(2) 糖修飾 CMD の合成

CMD 1 g を精製水 30 ml に溶解し、1-ethyl 3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) 1 g を加えた後、ethylenediamine 100 μl を加えた。操作中、反応液の pH は 6.5 に固定した。室温で一昼夜反応させた後、精製水に対して透析し、限外濾過により ethylenediamine 結合 CMD (EDA-CMD) を得た。第Ⅰ章【2】と同様の方法により、EDA-CMD と IME-thiogalactoside、IME-thiogalactoside を反応させることによりそれぞれ Gal-CMD、Man-CMD を合成し、Sephadex G-25 カラムを用いたゲル濾過および限外濾過により精製した。

(3) ara-C 結合体の合成

CMD 100 mg を DMF 中に懸濁し、isobutylchloroformate 105 μl と triethylamine 100 μl を加え、2 時間 -10 °C で反応させた。ここに ara-C 100 mg を加え室温で 3 日間反応させた後、精製水に対して透析し、限外濾過により ara-C-CMD を得た。ara-C-Gal-CMD の合成は、第Ⅱ章【2】(2)と同様の方法により、ara-C-CMD と IME-thiogalactoside とを反応させることにより行った。

【3】PLGA 誘導体の合成

(1) galactose 修飾 PLGA (Gal-PLGA) の合成

第Ⅰ章【2】と同様の方法により、ethylenediamine と IME-thiogalactoside とを室温で 24 時間反応させた後、この水溶液中に PLGA を添加し、徐々に PLGA と等量の EDC を加えた。操作中、反応液の pH は 5.0 に固定した。室温にて一昼夜反応させた後、精製水に対して透析し、限外濾過により濃縮した。反応時の PLGA と IME-thiogalactoside との比率を変化させることにより、修飾率の異なる Gal-PLGA を合成した。

(2) vitamin K₅ 結合体の合成

vitamin K₃ 20 mg を精製水 30 ml に溶解し、Gal₁₈-PLGA 40 mg を加えた後 EDC 40 mg を徐々に添加した。操作中、反応液の pH は 5.0 に固定した。室温で一昼夜反応させた後、精製水に対して透析し、限外濾過により精製した。

【4】CMD 誘導体、ara-C 結合体の物理化学的性質の評価

(1) 電荷

イオン交換樹脂 CM-Sephadex C-50 (陽イオン交換樹脂) および DEAE-Sephadex A-50 (陰イオン交換樹脂) (共に Pharmacia 社) を用いた吸着実験法により行った。各イオン交換樹脂 20 mg を 20 mM HEPES saline (pH 7.2) 5 ml で平衡化させ、0.2 mg/ml の濃度に調製した各誘導体の水溶液 0.5 ml を加えて 10 分間室温で振盪し、遠心分離後、上清中に残存した各誘導体の濃度を測定することにより樹脂への吸着量を算出し電荷の強度を評価した。

(2) 糖残基数の定量

糖を結合する前後の誘導体あたりの amino 基数の差から計算した。amino 基の定量は、Habeeb の方法に準じて glycine を標準物質として trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) を用いた呈色反応¹⁷⁹⁾により行った。

(3) ara-C 結合数の定量

波長 300 nm での吸光度または ³H-ara-C の放射活性を測定することにより行った。

(4) dextran の定量

glucose を標準物質として anthrone-硫酸法¹⁷⁷⁾により行った。

(5) ara-C 放出性の評価

ara-C 結合体を 0.1 M phosphate buffer (pH 5.0、7.0、7.4、8.0) に溶解し、セルロースチューブに封入し各 buffer 中に浸した。チューブを 37 °C でインキュベーションし、buffer 中の ara-C 濃度を波長 272 nm の吸光度から測定した。

血漿中での放出性は ³H-ara-C 結合体を用いて評価した。マウスより採取した血漿 300 μl に ³H-ara-C-CMD の 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) 溶液 100 μl を加え、37 °C でインキュベーションした。一定時間後、Sephadex G-25 カラムを用いたゲル濾過を行い、放射活性を測定することにより ³H-ara-C の放出性を評価した。

【5】PLGA 誘導体の物理化学的性質の評価

(1) 分子量

PLGA 誘導体の分子量の測定は、島津製作所株式会社の Shim-pack Diol-300 カラムを用いた高速

液体クロマトグラフィー (HPLC) により行った。溶出液には phosphate buffered saline (pH 7.4) を用い、既知の分子量を持つ 8 種類の標準タンパク質 (Pharmacia 社) を用いて作成した検量線から各誘導体の見かけの分子量を決定した。

(2) 糖残基数の定量

galactose を標準物質として anthrone-硫酸法¹⁷⁾により行った。

【6】放射標識体の合成

(1) ¹⁴C 標識 dextran 誘導体

¹⁴C-CMD、¹⁴C-Gal-CMD、¹⁴C-Man-CMD の合成は、第 I 章【4】(4)と同様の方法により合成した ¹⁴C-dextran を用い非標識体の合成法と同様の方法により行った。

(2) ³H 標識 ara-C 結合体

³H-ara-C を用い、非標識体の合成法と同様の方法により合成した。

(3) ¹¹¹In 標識 PLGA 誘導体

PLGA、Gal-PLGA、vitamin K₅-Gal₁₈-PLGA の ¹¹¹In 標識は、第 I 章【4】(1)と同様の方法で行った。

【7】静脈内急速投与後の体内挙動

(1) 組織分布実験

第 I 章【5】(1)と同様の方法で行った。

(2) 糖修飾 CMD と糖修飾 BSA の同時投与実験

¹¹¹In 標識糖修飾 BSA (1 mg/kg) を非標識糖修飾 CMD (10 mg/kg) と同時に尾静脈内投与した。投与 5 分 (¹¹¹In-Gal-BSA) あるいは 10 分後 (¹¹¹In-Man-BSA) に血漿ならびに肝臓を採取し、放射活性を測定した。また、¹⁴C-Man-CMD と非標識 Man-BSA についても同様の方法で検討し、投与 30 分後の放射活性を測定した。

(3) PLGA と BSA 誘導体の同時投与実験

¹¹¹In-PLGA (1 mg/kg) を非標識 BSA 誘導体 (20 mg/kg) と同時に尾静脈内投与し、1 時間後に肝臓を採取し放射活性を測定した。

(4) Gal-PLGA の肝臓での分解性の評価

¹¹¹In-Gal₁₈-PLGA の生理食塩水溶液を尾静脈より投与 (1 mg/kg) し、10、30 分、6 時間後に肝臓

を抽出し、精製水 5 ml でホモジネートした。直ちに冷却遠心 (20,000 rpm × 30 分、4 °C) し、得られた上清を Sephadex G-50 カラムを用いてゲル濾過し、放射活性を測定することにより分解性を評価した。

【8】各誘導体の定量 (放射活性の測定)

(1) ^{14}C 標識体および ^3H 標識体

第 I 章【7】(2) と同様の方法で行った。

(2) ^{111}In 標識体

第 I 章【7】(1) と同様の方法で行った。

【9】vitamin K₅ 結合体の血液凝固能改善効果

ddY 系雄性マウスに warfarin 水溶液 (1.5 mg/l) を飲料水として 7 日間摂取させることにより低プロトロンビン血症を誘発させた。このマウスに対し、vitamin K₅ あるいは vitamin K₅-Gal₁₈-PLGA を薬物量として 10 mg/kg の投与量で尾静脈より瞬時投与した。投与 2、3、4 時間後にエーテル麻酔下開腹し、大静脈より血液を 3.8 % sodium citrate buffer を含むシリンジ中に採取し、遠心操作により血漿を得た。各血漿中の血液凝固活性は、PT-テストワコー (和光純薬工業株式会社) を用いてプロトロンビン時間を測定することにより評価した¹²⁶⁾。

第Ⅲ章 実験の部

【1】試薬

ヒト型遺伝子組換え superoxide dismutase (SOD: 111-Ser) は旭化成株式会社より供与されたものを用いた。

【2】SOD 誘導体の合成

(1) 糖修飾 SOD

第Ⅰ章【2】と同様の方法で行った。

(2) SOD-carboxymethyl-dextran 結合体 (SOD-CMD)

carboxymethyl-dextran (CMD) は、平均分子量 10,000 の dextran を用いて第Ⅱ章【2】(1)と同様の方法で合成した。CMD 1 g を精製水 10 ml に溶解し、sodium metaperiodate 210 mg を加え、室温で 24 時間攪拌下反応させることにより酸化 CMD を得た。sodium hydrogen sulfite 添加により反応を停止後、透析および限外濾過により酸化 CMD を精製した。SOD 20 mg を 50 mM borate buffer (pH 10) 10 ml に溶解させた後、酸化 CMD を 60 mg 加え 4 °C で 2 時間攪拌して反応させ、1.8 mg の sodium borohydride で還元後、ゲル濾過 (TOYOPEARL HW-55S, 1.8 × 40 cm、東ソー株式会社) で未反応 SOD を分離することにより精製した。

(3) SOD-diethylaminoethyl-dextran 結合体 (SOD-DEAED)

diethylaminoethyl-dextran (DEAED) は、平均分子量 10,000 の dextran を用いて合成した。強アルカリ条件下、dextran 1 g を精製水 50 ml に溶解し、2-(diethylamino)ethyl chloride hydrochloride 2 g を加え、80 °C で 4 時間反応させた。反応終了後、精製水中で一昼夜透析し、限外濾過により濃縮後、凍結乾燥した。SOD への DEAED の結合は (2) と同様の方法により行った。

(4) SOD-polyethylene glycol 結合体 (SOD-PEG₂)¹⁴⁰⁾

SOD 20 mg を 50 mM borate buffer (pH 10) 10 ml に溶解させた後、平均分子量 10,000 の 2,4-bis(*O*-methoxypolyethylene-glycol)-6-chloro-*s*-triazine (生化学工業株式会社) を 300 mg 加え、4 °C で 4 時間攪拌して反応させた。反応終了後、(2) と同様の方法により精製した。

【3】SOD 誘導体の物理化学的性質と酵素活性の評価

(1) 分子量

第Ⅱ章【5】(1) と同様の方法で行った。

(2) 電荷

第Ⅱ章【4】（１）と同様の方法で行った。

（３）amino 基の定量

Habeeb の方法に準じて glycine を標準物質として trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) を用いた呈色反応¹⁷⁹⁾により行った。

（４）酵素活性の定量

SOD テストワコー (和光純薬株式会社) を用いて nitroblue tetrazolium (NTB) 還元法により行った。

【4】放射標識体の合成

第Ⅰ章【4】（１）と同様の方法により ¹¹¹In 標識を行った。

【5】静脈内急速投与後の体内挙動

（１）組織分布実験

第Ⅰ章【5】（１）と同様の方法で行った。

（２）糖修飾 SOD と糖修飾 BSA の同時投与実験

¹¹¹In 標識糖修飾 SOD (0.1 mg/kg) を非標識糖修飾 BSA (20 mg/kg) と同時に尾静脈内投与した。投与 30 分後に肝臓中放射活性を測定した。

【6】SOD 誘導体の定量 (放射活性の測定)

第Ⅰ章【7】（１）と同様の方法で行った。

【7】SOD 誘導体の治療効果の検討

（１）ラット肝虚血・再灌流障害モデルの作成

Kawamoto らの方法¹⁴³⁾に従い、体重 200 g 前後の Wistar 系雄性ラットに対し pentobarbital (50 mg/kg) 麻酔下胆管カニューレーションを施した後、門脈と肝動脈をクランメで閉塞して血流を遮断し、20 分後にクランメを外し血流を再開することにより肝虚血・再灌流障害モデルを作成した。障害の治療は生理食塩水に溶解した SOD および SOD 誘導体を、虚血開始 5 分前に 10,000 unit/kg の投与量で右大腿静脈より急速投与することにより行った。また、虚血前に生理食塩水のみを投与した群 (occlusion 群) と虚血以外の操作を行った後生理食塩水を投与した群 (sham operation 群) を対照群とした。

（２）sulfobromophthalein (BSP) の胆汁排泄を指標とした肝障害の評価

再灌流開始後 60 分の時点で BSP の生理食塩水溶液 0.2 ml を右大腿静脈から急速投与した。投

与直後から胆汁を 5 分毎に 1 時間までサンプリングし、胆汁中の BSP 量を波長 580 nm で測定した。肝障害の評価は BSP の胆汁への回収率 (F_a)、平均排泄速度 (t_a) を指標として行った。両パラメータは本文第Ⅲ章第 2 節 b で示した式に基づき BSP の胆汁中への排泄曲線を解析し算出した。

第Ⅳ章 実験の部

【1】試薬

bovine γ -immunoglobulins (corn fraction II、IgG)、soybean trypsin inhibitor (STI)、chicken egg white lysozyme (LZM) は Sigma 社より購入した。

【2】galactose 修飾タンパク質の合成

第Ⅰ章【2】と同様の方法で行った。

【3】galactose 修飾タンパク質の物理化学的性質

(1) 分子量

第Ⅱ章【5】(1)と同様の方法で行った。

(2) galactose 残基数の定量

第Ⅰ章【3】(1)と同様の方法で行った。

(3) amino 基の定量

第Ⅲ章【3】(3)と同様の方法で行った。

【4】放射標識体の合成

第Ⅰ章【4】(1)と同様の方法により ^{111}In 標識を行った。

【5】静脈内急速投与後の組織分布実験

第Ⅰ章【5】(1)と同様の方法で行った。

【6】galactose 修飾タンパク質の定量 (放射活性の測定)

第Ⅰ章【7】(1)と同様の方法で行った。

引 用 文 献

- 1) G. Ashwell and J. Harford, *Ann. Rev. Biochem.* **51**: 531 (1982).
- 2) B. Smedsrød, H. Pertoft, S. Gustafson and T. C. Laurent, *Biochem. J.* **266**: 313 (1990).
- 3) G. Y. Wu, in *The Liver: Biology and Pathobiology 2nd Edition*, (I. M. Arias, W. B. Jakoby, H. Popper, D. Schachter and D. A. Shafritz, eds.), Raven Press Ltd., New York, 1988, pp. 1303.
- 4) S. Gordon and S. Rabinowitz, *Adv. Drug Delivery Rev.* **4**: 27 (1989).
- 5) R. J. Fallon and A. L. Schwartz, *Adv. Drug Delivery Rev.* **4**: 49 (1989).
- 6) D. K. F. Meijer and P. Van der Sluijs, *Pharm. Res.* **6**: 105 (1989).
- 7) L. Fiume, C. Busi, G. Di Stefano and A. Mattioli, *Adv. Drug Delivery Rev.* **14**: 51 (1994).
- 8) 瀬崎 仁編、薬物送達法、医薬品の開発第 13 巻、廣川書店、1989.
- 9) 橋田 充、最新生物薬剤学 (栗津莊司、小泉 保編)、南江堂、1991、pp. 187.
- 10) A. G. Morell, R. A. Irvine, I. Sternlieb, I. H. Scheinberg and G. Ashwell, *J. Biol. Chem.* **243**: 155 (1968).
- 11) R. L. Hudgin, W. E. Pricer, G. Ashwell, R. J. Stockert and A. G. Morell, *J. Biol. Chem.* **249**: 5536 (1974).
- 12) T. Kawasaki and G. Ashwell, *J. Biol. Chem.* **251**: 1296 (1976).
- 13) I. Geffen and M. Spiess, *Int. Rev. Cytol.* **137B**: 181 (1992).
- 14) R. J. Stockert, *Physiol. Rev.* **75**: 591 (1995).
- 15) Y. C. Lee, R. R. Townsend, M. R. Hardy, J. Lönngren, J. Arnarp, M. Haraldsson and H. Lönn, *J. Biol. Chem.* **258**: 199 (1983).
- 16) M. R. Hardy, R. R. Townsend, S. M. Parkhurst and Y. C. Lee, *Biochemistry* **24**: 22 (1985).
- 17) R. R. Townsend, M. R. Hardy, T. C. Wong and Y. C. Lee, *Biochemistry* **25**: 5716 (1986).
- 18) K. G. Rice, O. A. Weisz, T. Barthel, R. T. Lee and Y. C. Lee, *J. Biol. Chem.* **265**: 18429 (1990).
- 19) S. E. Pontow, V. Kery and P. D. Stahl, *Int. Rev. Cytol.* **137B**: 221 (1992).
- 20) M. E. Taylor, *Biochem. Soc. Trans.* **21**: 468 (1993).
- 21) L. Fiume, A. Mattioli, C. Busi, P. G. Balboni, G. Barbanti-Brodano, J. de Vries, R. Altmann and Th. Wieland, *FEBS Lett.* **116**: 185 (1980).
- 22) L. Fiume, B. Bassi, C. Busi, A. Mattioli, G. Spinosa and H. Faulstich, *FEBS Lett.* **203**: 203 (1986).
- 23) G. Chaudhuri, A. Mukhopadhyay and S. K. Basu, *Biochem. Pharmacol.* **38**: 2995 (1989).
- 24) R. Sett, K. Sarkar and P. K. Das, *J. Infect. Dis.* **168**: 994 (1993).
- 25) L. Fiume, G. Di Stefano, C. Busi and A. Mattioli, *Biochem. Pharmacol.* **47**: 643 (1994).
- 26) E. A. Biessen, D. M. Beuting, H. Vietsch, M. K. Bijsterbosch and T. J. C. Van Berkel, *J. Hepatol.* **21**: 806 (1994).
- 27) M. Moonis, I. Ahmad and B. K. Bachhawat, *J. Drug Targeting* **1**: 147 (1993).
- 28) A. Trouet, M. Masquelier, R. Baurain and D. Deprez de Campeneere, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 626 (1982).
- 29) R. Duncan, P. Kopectová, J. Strohalm, I. C. Hume, J. B. Lloyd and J. Kopecek, *Br. J. Cancer* **57**: 147 (1988).

- 30) M. V. Pimm, A. C. Perkins, R. Duncan and K. Ulbrich, *J. Drug Targeting* **1**: 125 (1993).
- 31) E. J. Franssen, R. W. Jansen, M. Vaalburg and D. K. F. Meijer, *Biochem. Pharmacol.* **45**: 1215 (1993).
- 32) D. R. Vera, K. A. Krohn, R. C. Stadalnik and P. O. Scheibe, *Radiology* **151**: 191 (1984).
- 33) P. Reimer, R. Weissleder, A. S. Lee, J. Wittenberg and T. J. Brady, *Radiology* **177**: 729 (1990).
- 34) R. C. Stadalnik, M. Kudo, W. C. Eckelman and D. R. Vera, *Invest. Radiol.* **28**: 64 (1993).
- 35) V. Keegan-Rogers and G. Y. Wu, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **26**: 93 (1990).
- 36) F. S. Furbish, C. J. Steer, N. L. Krett and J. A. Barranger, *Biochim. Biophys. Acta* **673**: 425 (1981).
- 37) X. M. Lu, A. J. Fischman, S. L. Jyawook, K. Hendricks, R. G. Tompkins and M. L. Yarmush, *J. Nucl. Med.* **35**: 269 (1994).
- 38) C. H. Wu, J. M. Wilson and G. Y. Wu, *J. Biol. Chem.* **264**: 16985 (1989).
- 39) G. Y. Wu, J. M. Wilson, F. Shalaby, M. Grossman, D. A. Shafritz and C. H. Wu, *J. Biol. Chem.* **266**: 14338 (1991).
- 40) N. R. Chowdhury, R. M. Hays, V. R. Bommineni, N. Franki, J. R. Chowdhury, C. H. Wu and G. Y. Wu, *J. Biol. Chem.* **271**: 2341 (1996).
- 41) J. C. Perales, T. Ferkol, H. Beegen, O. D. Ratnoff and R. W. Hanson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 4086 (1994).
- 42) M. Yamamoto, N. Hayashi, Y. Miyamoto, T. Takehara, E. Mita, M. Seki, H. Fusamoto and T. Kamada, *Hepatology* **22**: 847 (1995).
- 43) H. Ishikawa, T. Hara, Y. Aramaki, S. Tsuchiya and K. Hosoi, *Pharm. Res.* **7**: 542 (1990).
- 44) D. Schouten, M. Van der Kooji, J. Muller, M. N. Pieters, M. K. Bijsterbosch and T. J. C. Van Berkel, *Mol. Pharmacol.* **44**: 486 (1993).
- 45) M. Nishikawa, Y. Ohtsubo, J. Ohno, T. Fujita, Y. Koyama, Y. Takakura, M. Hashida and H. Sezaki, *Int. J. Pharm.* **85**: 75 (1992).
- 46) Y. C. Lee, C. P. Stowell and M. J. Krantz, *Biochemistry* **15**: 3956 (1976).
- 47) D. J. Hnatowich, W. W. Layne and R. L. Childs, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **33**: 327 (1982).
- 48) S. V. Deshpande, R. Subramanian, M. J. McCall, S. J. DeNardo, G. L. DeNardo and C. F. Meares, *J. Nucl. Med.* **31**: 218 (1990).
- 49) C. F. Meares, M. J. McCall, D. T. Reardan, D. A. Goodwin, C. I. Diamanti and M. Mctigue, *Anal. Biochem.* **142**: 68 (1984).
- 50) W. M. Hunter and F. G. Greenwood, *Nature* **194**: 495 (1962).
- 51) Y. Takakura, A. Takagi, M. Hashida and H. Sezaki, *Pharm. Res.* **4**: 293 (1987).
- 52) M. Hashida and Y. Takakura, *J. Controlled Release* **31**: 163 (1994).
- 53) Y. Takakura and M. Hashida, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **18**: 207 (1995).
- 54) K. Yamaoka, Y. Tanigawara, T. Nakagawa and T. Uno, *J. Pharmacobio-Dyn.* **4**: 879-885 (1981).
- 55) J. R. Duncan and M. J. Welch, *J. Nucl. Med.* **34**: 1728 (1993).
- 56) Y. Arano, T. Mukai, T. Uezono, K. Wakisaka, H. Motonari, H. Akizawa, Y. Taoka and A. Yokoyama, *J. Nucl. Med.* **35**: 890 (1994).
- 57) J. Kuiper, A. Brouwer, D. L. Knook and T. J. C. van Berkel, in *The Liver: Biology and Pathobiology 3rd Edition*, (I. M. Arias, J. L. Boyer, N. Fausto, W. B. Jakoby, D. Schachter and D. A. Shafritz, eds.), Raven Press Ltd., New York, 1994, pp. 791.

- 58) S. Horiuchi, K. Takata and Y. Morino, *J. Biol. Chem.* **260**: 475 (1985).
- 59) K. Kawaguchi, M. Kuhlenschmidt, S. Roseman and Y. C. Lee, *J. Biol. Chem.* **256**: 2230 (1981).
- 60) D. C. Kim, Y. Sugiyama, H. Sato, T. Fuwa, T. Iga and M. Hanano, *J. Pharm. Sci.* **77**: 200 (1988).
- 61) Y. Sugiyama, D. C. Kim, H. Sato, S. Yanai, H. Satoh, T. Iga and M. Hanano, *J. Controlled Release* **13**: 157 (1990).
- 62) V. Duprez, M. Ferrer, V. Cornet, D. Olive and A. Dautry-Varsat, *J. Biol. Chem.* **266**: 1497 (1991).
- 63) H. Masui, L. Castro and J. Mendelsohn, *J. Cell Biol.* **120**: 85 (1993).
- 64) L. E. Gerlowski and R. K. Jain, *J. Pharm. Sci.* **72**: 1103 (1983).
- 65) P. H. Schlesinger, J. S. Rodman, T. W. Doebber, P. D. Stahl, Y. C. Lee, C. P. Stowell and T. B. Kuhlenschmidt, *Biochem. J.* **192**: 597 (1980).
- 66) P. D. Stahl, T. E. Wileman, S. Diment and V. L. Shepherd, *Biol. Cell* **51**: 215 (1984).
- 67) K. Yamaoka and T. Nakagawa, *J. Pharmacobio-Dyn.* **6**: 595 (1983).
- 68) A. Bernstein, E. Hurwitz, R. Maron, M. Sela and M. Wilchek, *J. Natl. Cancer Inst.* **60**: 379 (1978).
- 69) T. Kojima, M. Hashida, S. Muranishi and H. Sezaki, *J. Pharm. Pharmacol.* **32**: 30 (1980).
- 70) M. Hashida, A. Kato, T. Kojima, S. Muranishi, H. Sezaki, N. Tanigawa, K. Satomura and Y. Hikasa, *Gann* **72**: 226 (1981).
- 71) F. Levi-Schaffer, A. Bernstein, A. Meshore and R. Arnon, *Cancer Treat. Rep.* **66**: 107 (1982).
- 72) M. Hashida, Y. Takakura, S. Matsumoto, H. Sasaki, A. Kato, T. Kojima and H. Sezaki, *Chem. Pharm. Bull.* **31**: 2055 (1983).
- 73) Y. Takakura, S. Matsumoto, M. Hashida and H. Sezaki, *Cancer Res.* **44**: 2505 (1984).
- 74) M. Hashida, A. Kato, Y. Takakura and H. Sezaki, *Drug Metab. Dispos.* **12**: 492 (1984).
- 75) S. Matsumoto, Y. Arase, Y. Takakura, M. Hashida and H. Sezaki, *Chem. Pharm. Bull.* **33**: 2941 (1985).
- 76) R. Atsumi, K. Endo, T. Kakutani, Y. Takakura, M. Hashida and H. Sezaki, *Cancer Res.* **47**: 5546 (1987).
- 77) Y. Takakura, M. Kitajima, S. Matsumoto, M. Hashida and H. Sezaki, *Int. J. Pharm.* **37**: 135 (1987).
- 78) Y. Takakura, R. Atsumi, M. Hashida and H. Sezaki, *Int. J. Pharm.* **37**: 145 (1987).
- 79) K. Sato, K. Itakura, K. Nishida, Y. Takakura, M. Hashida and H. Sezaki, *J. Pharm. Sci.* **78**: 11 (1989).
- 80) A. Noguchi, T. Takahashi, T. Yamaguchi, K. Kitamura, Y. Takakura, M. Hashida and H. Sezaki, *Jpn. J. Cancer Res.* **82**: 219 (1991).
- 81) A. Noguchi, T. Takahashi, T. Yamaguchi, K. Kitamura, Y. Takakura, M. Hashida and H. Sezaki, *Bioconjugate Chem.* **3**: 132 (1992).
- 82) Y. Yasuda, T. Fujita, Y. Takakura, M. Hashida and H. Sezaki, *Chem. Pharm. Bull.* **38**: 2053 (1990).
- 83) T. Fujita, Y. Yasuda, Y. Takakura, M. Hashida and H. Sezaki, *J. Controlled Release* **11**: 149 (1990).
- 84) T. Fujita, Y. Yasuda, Y. Takakura, M. Hashida and H. Sezaki, *J. Pharmacobio-Dyn.* **14**: 623 (1991).
- 85) Y. Takakura, Y. Kaneko, T. Fujita, M. Hashida, H. Maeda and H. Sezaki, *J. Pharm. Sci.* **78**: 117 (1989).
- 86) Y. Takakura, T. Fujita, M. Hashida, H. Maeda and H. Sezaki, *J. Pharm. Sci.* **78**: 219 (1989).
- 87) K. Mihara, K. Sawai, Y. Takakura and M. Hashida, *Biol. Pharm. Bull.* **17**: 296 (1994).
- 88) R. W. Mowry and R. C. Millican, *Am. J. Pathol.* **29**: 523 (1953).
- 89) Y. Takakura, T. Fujita, M. Hashida and H. Sezaki, *Pharm. Res.* **7**: 339 (1990).

- 90) R. Mehvar, M. A. Robinson and J. M. Reynolds, *J. Pharm. Sci.* **83**: 1495 (1994).
- 91) R. Mehvar, M. A. Robinson and J. M. Reynolds, *J. Pharm. Sci.* **84**: 815 (1995).
- 92) M. Nishikawa, F. Yamashita, Y. Takakura, M. Hashida and H. Sezaki, *J. Pharm. Pharmacol.* **44**: 396 (1992).
- 93) H. S. Isbell, H. L. Frush and J. D. Moyer, *Tech. Assoc. Pulp. Paper Ind.* **40**: 739 (1957).
- 94) R. G. Melton, C. N. Wiblin, A. Baskerville, R. L. Foster and R. F. Sherwood, *Biochem. Pharmacol.* **36**: 113 (1987).
- 95) K. Mihara, M. Mori, T. Hojo, Y. Takakura, H. Sezaki and M. Hashida, *Biol. Pharm. Bull.* **16**: 158-162 (1993).
- 96) B. M. Brenner, T. H. Hostetter and H. D. Humes, *Am. J. Physiol.* **234**: F455 (1978).
- 97) J. K. Leypoldt, R. P. Frigon, K. W. DeVore and L. W. Henderson, *Kidney Int.* **31**: 855 (1987).
- 98) G. Arturson and G. Wallenius, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **1**: 76 (1964).
- 99) G. R. Gray, *Arch. Biochem. Biophys.* **163**: 426 (1974).
- 100) R. U. Lemieux, D. R. Bundle and D. A. Baker, *J. Am. Chem. Soc.* **97**: 4076 (1975).
- 101) M. Monsigny, A. C. Roche and P. Midoux, *Biol. Cell* **51**: 187 (1984).
- 102) R. W. Jansen, G. Molema, T. J. Ching, R. Oosting, G. Harms, F. Moolenaar, M. J. Hardonk and D. K. F. Meijer, *J. Biol. Chem.* **266**: 3343 (1991).
- 103) R. T. Lee and Y. C. Lee, *Biochemistry* **19**: 156 (1980).
- 104) B. A. Brown, R. D. Comeau, P. L. Jones, F. A. Liberatore, W. P. Neacy, H. Sands and B. M. Gallagher, *Cancer Res.* **47**: 1149 (1987).
- 105) M. E. Taylor, M. S. Leaning and J. A. Summerfield, *Am. J. Physiol.* **252**: E690 (1987).
- 106) S. A. Ali, J. F. Eary, S. D. Warren, C. C. Badger and K. A. Krohn, *Nucl. Med. Biol.* **15**: 557 (1988).
- 107) S. Demignot, M. V. Pimm, S. R. Thorpe and R. W. Baldwin, *Cancer Immunol. Immunother.* **33**: 359 (1991).
- 108) S. R. Thorpe, J. W. Baynes and Z. C. Chroneos, *FASEB J.* **7**: 399 (1993).
- 109) D. T. Connolly, R. R. Townsend, K. Kawaguchi, M. K. Hobish, W. R. Bell and Y. C. Lee, *Biochem. J.* **214**: 421 (1983).
- 110) K. Ogawara, M. Nishikawa, Y. Takakura and M. Hashida, *Proc. Int. Symp. Controlled Release Bioact. Mater.* 665 (1996).
- 111) Y. Takakura, R. I. Mahato, M. Nishikawa and M. Hashida, *Adv. Drug Delivery Rev.* in press.
- 112) 橋田 充、高倉喜信、生体内薬物送達学、産業図書株式会社、1994.
- 113) L. Fiume, C. Busi, P. Preti and G. Spinosa, *Cancer Drug Deliv.* **4**: 145 (1987).
- 114) M. Nishikawa, A. Kamijo, T. Fujita, Y. Takakura, H. Sezaki and M. Hashida, *Pharm. Res.* **10**: 1253 (1993).
- 115) H. Hirabayashi, M. Nishikawa, Y. Takakura and M. Hashida, *Pharm. Res.* **13**: 880 (1996).
- 116) M. Hashida, H. Hirabayashi, M. Nishikawa and Y. Takakura, *J. Controlled Release* in press.
- 117) P. D. G. Dean, P. H. Rowe and D. Exley, *Steroids Lipids Res.* **3**: 82 (1972).
- 118) J. Munniksmä, M. Noteborn, S. Kooistra, J. M. W. Bouma, A. Gruber, D. P. V. Dalen and K. L. Knok, *Biochem. J.* **192**: 613 (1980).

- 119) H. Hackbarth, D. Büttner and K. Gärtner, *Am. J. Physiol.* **242**: R303 (1982).
- 120) V. Vetvicka and L. Fornusek, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **5**: 141 (1988).
- 121) R. Duncan, *Ant-cancer Drugs* **3**: 175 (1992).
- 122) W. C. Shen and H. J. P. Ryser, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **102**: 1048 (1981).
- 123) P. Rejmanová, J. Kopecek, J. Pohl, M. Baudys and V. Kostka, *Macromol. Chem.* **184**: 2009 (1983).
- 124) J. B. Lloyd and S. Forster, *Trends Biochem. Soc.* **11**: 365 (1986).
- 125) 森田隆司、岩永貞昭、ビタミン学〔I〕（ビタミン学会編）、東京化学同人、1980、pp. 237.
- 126) W. J. Williams, *J. Biol. Chem.* **241**: 1840 (1966).
- 127) Y. Takakura, T. Fujita, H. Furitsu, M. Nishikawa, H. Sezaki and M. Hashida, *Int. J. Pharm.* **105**: 19 (1994).
- 128) T. Fujita, M. Nishikawa, Y. Ohtsubo, J. Ohno, Y. Takakura, H. Sezaki and M. Hashida, *J. Drug Targeting* **2**: 157 (1994).
- 129) N. Simionescu, *Physiol. Rev.* **63**: 1536 (1983).
- 130) S. Nakane, S. Matsumoto, Y. Takakura, M. Hashida and H. Sezaki, *J. Pharm. Pharmacol.* **40**: 1 (1988).
- 131) M. P. Bohrer, C. Baylis, H. D. Humes, R. J. Glassock, C. R. Robertson and B. M. Brenner, *J. Clin. Invest.* **61**: 72 (1978).
- 132) D. H. W. Ho and E. Frei, *Clin. Pharmacol. Ther.* **12**: 944 (1971).
- 133) Y. Kato, M. Saito, H. Fukushima, Y. Takeda and T. Hara, *Cancer Res.* **44**: 25 (1984).
- 134) S. Dreborg and E. B. Åkerblom, *CRC Crit Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **6**: 315 (1990).
- 135) R. Duncan and F. Spreafico, *Clin. Pharmacokinet.* **27**: 290 (1994).
- 136) T. Fujita, M. Nishikawa, C. Tamaki, Y. Takakura, M. Hashida and H. Sezaki, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **263**: 971 (1992).
- 137) T. Fujita, H. Furitsu, M. Nishikawa, Y. Takakura, H. Sezaki and M. Hashida, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**: 191 (1992).
- 138) D. Triguero, J. B. Buciak and W. M. Pardridge, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **258**: 186 (1991).
- 139) A. Bernstein, E. Hurwitz, R. Maron, M. Sela and M. Wilchek, *J. Natl. Cancer Inst.* **60**: 379 (1978).
- 140) A. Matsushima, H. Nishimura, Y. Ashihara, Y. Yokota and Y. Inada, *Chem. Lett.* **7**: 773 (1980).
- 141) D. P. Praaning-Van Dalen, A. Brouwer and D. L. Knook, *Gastroenterology* **81**: 1036 (1981).
- 142) 西田俊朗、川島康生、田川邦夫、代謝 **24**: 379 (1987).
- 143) S. Kawamoto, M. Inoue, S. Tashiro, Y. Morino and Y. Miyauchi, *Arch. Biochem. Biophys.* **277**: 160 (1990).
- 144) R. P. J. Oude Elferink, D. K. F. Meijer, F. Kuipers, P. L. M. Jansen, A. K. Groen and G. M. M. Groothuis, *Biochim. Biophys. Acta* **1241**: 215 (1995).
- 145) T. Kakutani, K. Yamaoka, M. Hashida and H. Sezaki, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **13**: 609 (1985).
- 146) K. Yamaoka, T. Nakagawa and T. Uno, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **13**: 609 (1985).
- 147) 井上正康編、活性酸素と病態－疾患モデルからベッドサイドへ－、学会出版センター、1992.
- 148) D. N. Granger, G. Rutili and J. M. McCord, *Gastroenterology* **81**: 22 (1981).
- 149) D. Adkinson, M. E. Hollwarth, J. N. Benoit, D. A. Parks, J. M. McCord and D. N. Granger, *Acta*

- Physiol. Scand.* **548** (Suppl.): 101 (1986).
- 150) R. E. Ratych, R. S. Chuknyiska and G. B. Bulkley, *Surgery* **102**: 122 (1987).
 - 151) B. Rymsa, J. F. Wang and H. De Groot, *Am. J. Physiol.* **261**: G602 (1991).
 - 152) T. Nishino, C. Usami and K. Tsushima, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 1826 (1983).
 - 153) D. A. Parks and D. N. Granger, *Acta Physiol. Scand.* **548** (Suppl.): 87 (1986).
 - 154) T. D. Engerson, T. G. McKelvey, D. B. Rhyne, E. B. Boggio, S. J. Snyder and H. P. Jones, *J. Clin. Invest.* **79**: 1564 (1987).
 - 155) T. G. McKelvey, M. E. Höllwarth, D. N. Granger, T. D. Engerson, U. Landler and H. P. Jones, *Am. J. Physiol.* **254**: G753 (1988).
 - 156) B. Y. Yu, *Physiol. Rev.* **74**: 139 (1994).
 - 157) 井上正康、江端 巖、安東由喜雄、渡辺信和、内海俊彦、蛋白質・核酸・酵素、**33**: 2889 (1988).
 - 158) A. Cudd and I. Fridovich, *J. Biol. Chem.* **257**: 11443 (1982).
 - 159) E. D. Getzoff, J. A. Tainer, P. K. Weiner, P. A. Kollman, J. S. Richardson and D. C. Richardson, *Nature* **306**: 287 (1983).
 - 160) G. L. Sottocasa, G. Baldini, G. Sandi, G. Lunazzi and C. Tribelli, *Biochim. Biophys. Acta* **685**: 123 (1982).
 - 161) E. Jacquemin, B. Hagenbuch, B. Stieger, A. W. Wolkoff and P. J. Meier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 133 (1994).
 - 162) G. A. Kullak-Ublick, B. Hagenbuch, B. Stieger, A. W. Wolkoff and P. J. Meier, *Hepatology* **20**: 411 (1994).
 - 163) F. Kuipers, M. Enserink, R. Havinga, A. B. M. Van der Steen, M. J. Hardonk, J. Fevery and R. J. Vonk, *J. Clin. Invest.* **81**: 1593 (1988).
 - 164) P. L. M. Jansen, J. W. Vanklinken, M. Vangelder, R. Ottenhoff and R. P. J. Oude Elferink, *Am. J. Physiol.* **265**: G445 (1993).
 - 165) Y. Takakura, S. Masuda, H. Tokuda, M. Nishikawa and M. Hashida, *Biochem. Pharmacol.* **47**: 853 (1994).
 - 166) K. Mihara, Y. Oka, K. Sawai, Y. Takakura and M. Hashida, *J. Drug Targeting* **2**: 317 (1994).
 - 167) K. Nishida, C. Tonegawa, S. Nakane, Y. Takakura, M. Hashida and H. Sezaki, *Int. J. Pharm.* **65**: 7 (1990).
 - 168) K. Nishida, K. Mihara, T. Takino, S. Nakane, Y. Takakura, M. Hashida and H. Sezaki, *Pharm. Res.* **8**: 437 (1991).
 - 169) K. Nishida, T. Takino, Y. Eguchi, F. Yamashita, M. Hashida and H. Sezaki, *Int. J. Pharm.* **80**: 101 (1992).
 - 170) S. Choksakulnimitr, S. Masuda, H. Tokuda, Y. Takakura and M. Hashida, *J. Controlled Release* **34**: 223 (1995).
 - 171) K. Mihara, T. Hojo, M. Fujimawa, Y. Takakura, H. Sezaki and M. Hashida, *Pharm. Res.* **10**: 823 (1993).
 - 172) M. Nishikawa, H. Hirabayashi, Y. Takakura and M. Hashida, *Pharm. Res.* **12**: 209 (1995).
 - 173) M. Nishikawa, C. Miyazaki, F. Yamashita, Y. Takakura and M. Hashida, *Am. J. Physiol.* **268**: G849 (1995).
 - 174) C. A. Hoppe and Y. C. Lee, *J. Biol. Chem.* **258**: 14193 (1983).

- 175) D. R. Vera, K. A. Krohn, R. C. Stadalnik and P. O. Scheibe, *J. Nucl. Med.* **25**: 779 (1984).
- 176) S. Miller, J. Janin, A. M. Lesk and C. Chothia, *J. Mol. Biol.* **196**: 641-656 (1987).
- 177) T. A. Scott and E. H. Melvin, *Anal. Chem.* **25**: 1565 (1953).
- 178) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.* **193**: 265 (1951).
- 179) A. F. S. A. Habeeb, *Anal. Biochem.* **14**: 328 (1966).